SÉRIE A
N° D'ORDRE : 115

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean BERNET

Première thèse. — MODE D'ACTION DES GÈNES DE « BARRAGE » ET RELATION ENTRE L'INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET L'INCOMPATIBILITÉ SEXUELLE CHEZ « PODOSPORA ANSERINA ».

Deuxième thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ : LES MUTANTS LÉTAUX CONDITIONNELS DU PHAGE T_4.

Soutenues le 30 juin 1965 devant la Commission d'examen.

MM. MANGENOT ..... *Président.*
RIZET .....
M^me^ GANS ..... *Examinateurs.*
M. BRUN .....

PARIS
MASSON & C^ie^, ÉDITEURS
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120
1965

SÉRIE A
N° D'ORDRE : 115

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jean BERNET

Première thèse. — MODE D'ACTION DES GÈNES DE « BARRAGE » ET RELATION ENTRE L'INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET L'INCOMPATIBILITÉ SEXUELLE CHEZ « PODOSPORA ANSERINA ».

Deuxième thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ : LES MUTANTS LÉTAUX CONDITIONNELS DU PHAGE T_4.

Soutenues le 30 juin 1965 devant la Commission d'examen.

MM. MANGENOT ..... *Président.*
RIZET .....
M^me^ GANS ..... *Examinateurs.*
M. BRUN .....

PARIS
MASSON & C^ie^, ÉDITEURS
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120
1965

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen ..... M. ZAMANSKY.

PROFESSEURS

BRELOT	T	Analyse supérieure.
PRENANT	T	Anat. et Histol. comp.
GRASSÉ	T	Evol. des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et cristall.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végét. (Orsay).
AUGER	T	Physique quant. et relat.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).
CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
N...	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biol. anim. (S. P. C. N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et sédimentologie (Orsay).
GAUTHERET	T	Biologie végét. (P. C. B.).
R. LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Enseig. de physique.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).
FORTIER	T	Mécan. expér. des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biol. végét. (S. P. C. N.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
L'HÉRITIER	T	Biologie gén. (Orsay).
GRIVET	T	Radio-Electricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie org. et structur.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosph.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristall.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique).
COUTEAUX	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie.
CHOQUET	T	Théor. des fonctions et topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Phys. des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathémat.
SCHWARTZ	T	Calc. diff. et intégr.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviat. (Tech. aéronaut.).
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathémat.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiol. végétale appl.
MARÉCHAL	T	Optique théor. et appl.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiol. de la nutr.
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anat. et histol. comp.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
GLANGEAUD	T	Géogr. phys. et géol. dyn.
GODEMENT	T	Mathématiques (M. G. P.).
PISOT	T	Techniques mathémat. de la Physique.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Electrotechn. génér.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énerg. (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY	T	Biol. végétale (P. C. B.).
PANNETIER	T	Chimie générale.
BRUN	T	Mécan. des fluides I.
LEDERER	T	Chimie biol. (Orsay).
Mme DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation).
Mme LELONG	T	Mathématiques II (E. N. S.).
BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
COTTE	T	Physique électricité.
J.-E. DUBOIS	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
A. MICHEL	T	Chimie minér. (Orsay).
OLMER	T	Energétique générale.
ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Phys. végétale.
CASTAING	T	Physique II. Thermod. (Orsay).
CURIEN	T	Minéral. et cristallogr.
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).
Mme CHARNIAUX-COTTON	T	Evol. des êtres organisés
POSSOMPÈS	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Physique nucl. et radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T	Biol. phys.-chim. (Orsay).
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
DODÉ	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biologie vég. (S. P. C. N.) (Orsay).
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY	T	Mathémat. générales.
G. LUCAS	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Phys. des partic. Fond. (Orsay).
BRICARD	T	Météorol. et physique de l'atmosphère (Orsay).
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie.
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay).
M. JULIA	T	Etudes des moléculaires complexes.
LENDER	T	Biol. animale (S. P. C. N.) (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chim. des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie.

Professeurs *(suite)*.

Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiol. anim. (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lémée	T	Ecologie vég. (Orsay).
Guérin	T	Chimie (M. P. C.) (Orsay).
M. Chatelet	T	Chimie (P. C. B.).
Jean	T	Phys. nucl. (Orsay).
Mattler	T	Physique (S. P. C. N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissières	T	Radiochimie.
Mme Couture	T	Thermodyn. et méc. phys.
Ellenberger	T	Géol. des grandes régions du globe (Orsay).
Franc	T	Biol. animale (P. C. B.).
Schnell		Botanique tropicale.
Stolkowski	T	Physiologie végétale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin	T	Biol. anim. (P. C. B.).
Beaumont		Biol. anim. (S. P. C. N.).
Blamont	T	Géophys., Ionosphère.
Bourreau	T	Botanique.
D. Curie		Physique (M. G. P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Fréon	T	Chimie organ. (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux	T	Géologie (S. P. C. N.).
Magnan		Physique, électricité.
Daudel	T	Mécan. ondul. appl. à la chimie théor. et à la physique nucléaire.
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S. P. C. N.).
Chevalley	T	Géométr. algébr. et théor. des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique I (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathém. génér. (Orsay).
Germain	T	Mécan. théor. des fluides.
Lacombe	T	Métal. des métaux Nucl. (Orsay).
Brochard	T	Phys. (M.G.P.) (Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécan. génér. (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géol. dynamique.
Comolet		Mécanique des fluides.
Coraboeuf	T	Physiol. anim. (Orsay).
Delloue	T	Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biol. anim. (P. C. B.).
Jullien J.		Chimie (S.P.C.N.) (Orsay).
Malgrange	T	Tech. math. de la phys. (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Phys. (E. N. S.) (Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathém. (E.N.S. fémin.).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique (S. P. C. N.).
Amat	T	Physique (P. C. B.).
Auboin	T	Géologie.
Mme Benoit-Gueutal	T	Phys. nucl. et radio-act. (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-mer).
Bruhat	T	Mathématiques (M. P. C.).
Brunn	T	Géol. histor. (Orsay).
Chabbal	T	Phys. (M. G. P.) (Orsay).
Deheuvels	T	Mathématique propé.
D'Espagnat	T	Physique théor. (Orsay).
Furon	T	Géologie (S. P. C. N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Genèves		Biologie végét. (P. C. B.).
Guilbert		Phys. (C. U. S. Orléans).
Hupe	T	Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte	T	Chimie (P. C. B.).
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Mlle Fourcroy		Biol. végét. (S. P. C. N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Méc. analytique et mécan. céleste.
Mlle Veil	T	Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécan. phys. et expér.
Néron	T	Math. (M. P. C.) (Orsay).
Mme Pecker-Wimel	T	Astrophysique.
Balkansky		Physique (M. P. C.).
Le Corre	T	Electricité.
Delcroix	T	Phys. théorique (Orsay).
Gourdin		Phys. théor. des Hautes-Énergies (Orsay).
Lehmann	T	Phys. exp. des Hautes-Énergies.
Nataf	T	Phys. nucl. et radio-activité (Orsay).
Echalier		Biol. anim. (P. C. B.)
Barraud		Physiologie cellulaire.
Lioret	T	Physiol. végétale (Orsay).
Dars		Géol. struc. et Géol. appl.
Camefort	T	Botanique (agrégation).
Vichniewsky	T	Mécanique industrielle.
Blaquière		Electronique (Orsay).
Arnous	T	Physique théorique.
Tatibouet		Chimie (C.S.U. Orléans).
Malliavin	T	Math. propéd. (Orsay).
Gaudemar		Chimie propéd.
Perez y Jorba		Phys. exp. des Hautes-énergies (Orsay).
David	T	Chimie (Agrég. Orsay).
Brousse	T	Mécanique théorique.
Rosch	T	Astronomie.
Guy	T	Physique expérim.
Lazard		Mathématiques (M. P. C.).
P. Morel		Physique (M. P. C.).
Arsac		Programmation.
Lefebvre		Chimie (M. P. C.).
Chapeville		Biochimie.
Benoit		Physique (C. P. E. M.).
Rio		Chimie (C. P. E. M.).
Jauzein		Géologie (E. N. S.).
G. Prévost		Biologie vég. (C.P.E.M.).
P. Favard		Biologie an. (C.P.E.M.).
Vilkas		Chimie (C. P. E. M.).
Mlle Ficini		Chimie (C. P. E. M.).
Lequeux		Astronomie.
Cohen Tannoudji		Physique (M. P. C.).
Tavernier		Physique (C. P. E. M.).
Mme Roizen		Physique (C. P. E. M.).
M. Durand		Biologie an. (S.P.C.N.).
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécan. théor. des fluides.
Roubine	T	Electronique.
Silber	T	Chimie P. C. B.
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories physiques.
Hervé	T	Mathématiques.
Jancovici		Physique atom. (Orsay).
Falk-Vairant		Physique nucl. (Orsay).
Fetizon		Chimie propéd. (Orsay).
Cerf		Mathématiques (Orsay).
Pascaud		Physiologie.
Mme Petit		Biologie an. (C. P. E. M.).
Brousse		Géologie (Orsay).
Cagnac		Physique agr. (Orsay).
Leberre		Zoologie (Orsay).
Schaeffer		Microbiologie (Orsay).
De Gennes		Phys. des sol. (Orsay).
Riou		Phys. nucl. exp. (Orsay).
Clauser		Chimie biol. (Orsay).
Chevalier		Physiologie an. (Orsay).

Secrétaire général ..... R. Poullain.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0024

Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Paris.
12e Série, Tome **VI**, pp. 611-768.

MODE D'ACTION DES GÈNES DE « BARRAGE » ET RELATION ENTRE L'INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET L'INCOMPATIBILITÉ SEXUELLE CHEZ *PODOSPORA ANSERINA*

Par J. BERNET

SOMMAIRE

INTRODUCTION 613

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER. — ***Matériel biologique utilisé*** 617

CHAPITRE II. — ***Techniques*** 623

DEUXIÈME PARTIE

DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE L'INCOMPATIBILITÉ

CHAPITRE PREMIER. — ***L'incompatibilité entre les souches s et A*** 632

CHAPITRE II. — ***L'incompatibilité entre souches A, B, E, F, S et s*** 649

CHAPITRE III. — ***Conclusion de la deuxième partie*** 660

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE GÈNES D'INCOMPATIBILITÉ

CHAPITRE PREMIER. — ***Les déterminants cytoplasmiques de l'incompatibilité*** . 667

A. — La réaction de barrage et ses modalités 667

B. — Etude de l'expression phénotypique des gènes d'incompatibilité : les déterminants cytoplasmiques de l'incompatibilité 673

C. — Conclusion 683

CHAPITRE II. — ***L'auto-incompatibilité*** 686

A. — Evolution des thalles auto-incompatibles 686

B. — Analyse de l'interaction entre les deux gènes d'un même système d'incompatibilité au cours du croisement et de la croissance des descendants 691

C. — Discussion et conclusion 703

CHAPITRE III. — ***L'incompatibilité sexuelle*** 705

A. — Définition des différents types de croisements 705

B. — La stérilité est due aux propriétés de la microconidie 707

C. — La stérilité est due aux propriétés des protopérithèces 715

D. — Conclusions 725

CHAPITRE IV. — ***Conclusion de la troisième partie*** 727

QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

CHAPITRE PREMIER. — ***Mode d'expression des gènes de barrage*** 733

A. — Nature des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité 733

B. — Degré de signification des tests phénotypiques 735

C. — Propriétés de l'expression des gènes 736

CHAPITRE II. — ***Relation entre l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle*** 743

CHAPITRE III. — ***Rôle de l'incompatibilité dans le processus de spéciation*** . 747

RÉSUMÉ 752

BIBLIOGRAPHIE 759

PLANCHES I et II 763

INTRODUCTION

Le terme d'incompatibilité recouvre des phénomènes biologiques très divers. Il s'agit, par exemple, de l'impossibilité d'une fécondation entre individus appartenant ou non à une même unité systématique et dont les gamètes sont par ailleurs viables et normaux. Il peut s'agir de de l'inviabilité d'un hybride dont la létalité se manifeste à un stade plus ou moins précoce du développement. Le même terme évoque encore l'échec d'une greffe entre tissus, c'est-à-dire l'histo-incompatibilité.

Toutefois, malgré la diversité des situations, on peut grouper ces phénomènes en deux catégories seulement : l'incompatibilité sexuelle qui se manifeste entre gamètes et empêche la fécondation et l'incompatibilité cellulaire qui se manifeste, soit au sein d'une cellule hybride et entraîne sa mort, soit au cours de la confrontation de cellules ou de tissus.

A l'exception de l'auto-incompatibilité chez certains végétaux, appelée « homogenic incompatibility » (Esser, 1964), tous les autres phénomènes d'incompatibilité présentent un point commun : ils impliquent toujours une différence génétique entre éléments incompatibles. Entre deux espèces, cette différence peut être importante et souvent accompagnée d'une disparité du nombre et de l'aspect des chromosomes; au contraire, la différence génétique peut être discrète comme c'est le cas pour l'histo-incompatibilité chez les animaux supérieurs, où elle peut résulter d'une différence monogénique.

Sous l'un ou l'autre de ses aspects, l'incompatibilité est très répandue chez la plupart des êtres vivants et, malgré la diversité de ses manifestations, un phénomène aussi constant doit avoir une signification physiologique extrêmement générale. Mais la nature même du phénomène en rend l'analyse difficile : la stérilité du croisement ou l'inviabilité des hybrides ne sont évidemment pas favorables à l'étude génétique; l'étude du mécanisme physiologique nécessite la réunion des génotypes incompatibles dans des conditions variées : croisements, greffes, hétérocaryoses, difficilement réalisables chez un même organisme; enfin, l'étude n'est possible que si les différences génétiques entre éléments incompatibles sont peu nombreuses et facilement analysables.

Il se trouve que l'Ascomycète *Podospora anserina,* réunit un certain nombre de qualités qui en font un matériel idéal pour l'étude de l'incompatibilité. On trouve en effet toutes les manifestations d'incompa-

tibilité entre les souches sauvages de cette espèce : incompatibilité cellulaire traduite par la formation de barrage au niveau des anastomoses entre hyphes de génotypes différents (Rizet et Schecroun, 1959; Bernet, 1963) et par l'apparition de descendants létaux; incompatibilité sexuelle totale ou partielle affectant l'un ou l'autre ou les deux croisements réciproques entre deux souches.

D'autre part, *Podospora* est un matériel très favorable à l'analyse génétique grâce à plusieurs de ses propriétés biologiques (Rizet et Engelman, 1952). On sait, en particulier, que chaque souche isolée de la nature est pratiquement isogénique; on sait également que les différences entre souches sauvages ne portent généralement que sur un nombre limité de gènes (Bernet et al., 1960).

Dans les cas analysés, le déterminisme des différentes manifestations de l'incompatibilité s'est révélé simple : il consiste en l'interaction de deux gènes (Rizet et Esser, 1953; Esser, 1954). Le fait qu'une même interaction génétique pouvait, dans certains cas, déterminer à la fois l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle, laissait supposer l'existence d'un lien entre ces deux aspects, et l'on pouvait espérer étudier l'incompatibilité sous sa forme la plus générale.

Nous avons donc entrepris l'étude des différentes manifestations de l'incompatibilité entre six souches sauvages prises deux à deux. Après avoir fait l'analyse génétique des différences entre ces souches et retrouvé le fait que le déterminisme de base de l'incompatibilité réside toujours en une interaction de deux gènes seulement, nous avons cherché à préciser le mécanisme physiologique de ces interactions et à comprendre comment et pourquoi la même interaction pouvait avoir des conséquences aussi diverses qu'un barrage, une incompatibilité sexuelle et des descendants létaux.

Notre exposé sera conduit de la manière suivante. Dans une première partie nous décrirons l'organisme et les techniques utilisées. Dans une deuxième partie nous étudierons le déterminisme génétique de l'incompatibilité entre les six souches. Cette étude nous permettra de définir des « systèmes élémentaires « d'incompatibilité, c'est-à-dire des couples de gènes allèles ou non allèles dont l'interaction suffit à en provoquer toutes les manifestations. La troisième partie sera consacrée à l'étude physiologique de l'interaction entre les gènes antagonistes de quelques-uns de ces systèmes élémentaires d'incompatibilité. Nous serons amené à comprendre pourquoi la même situation génétique — présence dans un même cytoplasme de deux gènes incompatibles — se manifeste différemment au cours des diverses phases du cycle ou selon la nature des éléments confrontés (gamètes ou cellules végétatives). Ceci nous amènera, au cours de la discussion, à situer nos résultats dans le cadre du problème très général du mode d'action des gènes et à envisager le rôle des gènes d'incompatibilité dans le processus de spéciation.

*
**

Ces recherches, commencées au Laboratoire de Génétique physiologique du C. N. R. S. à Gif-sur-Yvette, ont été continuées au Laboratoire de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon et au Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences d'Orsay.

Podospora anserina avait déjà fait l'objet de nombreuses études au laboratoire de M. RIZET, où ce matériel est encore utilisé par plusieurs chercheurs. Nous avons donc trouvé dès l'origine un matériel important et bien domestiqué, des techniques de culture et d'analyse éprouvées et des camarades de travail ayant une parfaite connaissance de cette espèce et des problèmes posés. Le sujet traité est d'ailleurs la continuation de plusieurs études antérieures : celles de RIZET et ESSER sur l'incompatibilité entre souches sauvages et celles de RIZET et BEISSON sur l'analyse des phénomènes de barrage entre souches S et s.

Notre premier contact avec la biologie s'est effectué au Laboratoire d'Adiopodoumé, en Côte d'Ivoire, et il nous est particulièrement agréable de remercier M. le Pr MANGENOT, qui dirigeait alors ce laboratoire, d'avoir accepté de présider notre jury.

L'intérêt que Mme GANS, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, a porté à notre travail a été très précieux pour l'exposé de nos résultats et leur discussion. Nous la remercions bien vivement. Nous avons également été très sensible aux conseils de M. BRUN, Maître de Conférences, pour tout ce qui concerne l'analyse statistique de nos résultats.

Notre gratitude va également à M. le Pr CHEVAUGEON, Mlle MARCOU, Mme LEFORT et M. DESJARDINS pour leurs conseils amicaux et l'aide apportée en maintes circonstances, ainsi qu'à M. le Pr EMBERGER qui a accepté de publier ce mémoire dans les *Annales des Sciences Naturelles*.

M. DER KHATCHADOURIAN, Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon nous a constamment marqué son bienveillant intérêt et apporté son aide. Nous le remercions bien vivement. Nous n'oublierons pas M. MAILLARD dont la collaboration technique très minutieuse et le dévouement à toute épreuve nous ont été très précieux.

Notre dette vis-à-vis de Mme BEISSON est particulièrement lourde : qu'il s'agisse de l'apprentissage de techniques, de suggestions et de critiques relatives aux expériences et de la mise en ordre et de la discussion des résultats, son soutien patient et efficace ne nous a jamais manqué. Nous y sommes particulièrement sensible.

M. le Pr RIZET a été l'initiateur de cette étude. Tout au long de ce travail, ses conseils, ses critiques et son sens aigu des problèmes biologiques m'ont permis de mener à bien ces recherches. Qu'il trouve ici l'expression de mon affection et ma profonde gratitude.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL BIOLOGIQUE UTILISÉ

Podospora anserina (syn. *Pleurage anserina* [Ces] Küntze) est un Ascomycète coprophile appartenant au groupe des Pyrénomycètes. C'est une espèce tétrasporée; les asques sont ordonnés et les ascospores normalement binucléées. Il arrive qu'une spore normale soit remplacée par deux spores uninucléées; l'asque contient alors cinq spores (Pl. I, *A*) (1).

Cet organisme, qui a déjà fait l'objet de nombreuses études biologiques et génétiques (Ames, 1943; Rizet, 1943; Rizet et Engelman, 1949; Esser, 1959; Beisson-Schecroun, 1962; Marcou, 1962), a été décrit à de multiples reprises. Nous nous bornerons à rappeler quelques données essentielles à la compréhension de notre travail.

A. — LE CYCLE DE PODOSPORA ANSERINA *ET LES PHÉNOMÈNES DE SÉGRÉGATION DANS L'ASQUE*

Chaque asque est hétérozygote pour le couple d'allèles +/— responsable de l'hétérothallisme. Au cours de l'histoire nucléaire de l'asque, schématisée par la figure 1, la ségrégation de ce couple ou de tout autre couple d'allèles conduit, soit à une pré-réduction (fig. 1, *a*), soit

(1) Voir les planches I et II, p. 763.

à une post-réduction (fig. 1, *b*). Par suite de la disposition particulière des fuseaux au cours de la méiose, chaque spore normale contient deux noyaux non frères; ces deux noyaux sont génétiquement différents dans le cas de post-réduction. Le couple d'allèles (+/—) est presque toujours post-réduit. Les spores binucléées contiennent donc, dans ce cas, un noyau + et un noyau —; ces spores hétérocaryotiques donnent des souches autofertiles. Les spores uninucléées conduisent à des souches toujours homocaryotiques soit +, soit —; les

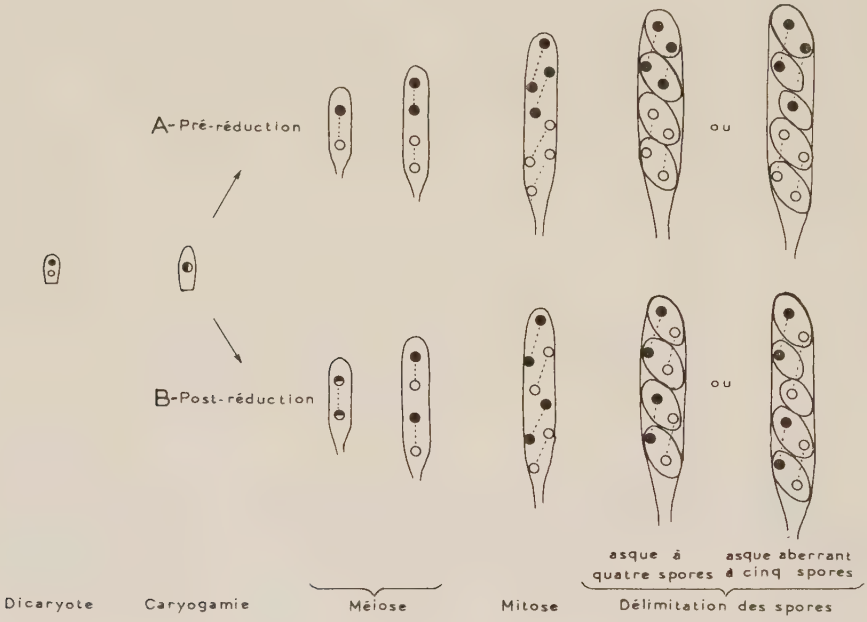


Fig. 1. — Histoire caryologique de l'asque.

souches le plus souvent utilisées au cours de ce travail ont cette origine.

Tous les mycéliums produisent des organes femelles ou protopérithèces et des organes mâles ou microconidies. La microconidie est un élément uninucléé de taille réduite (2 µ). L'élément femelle ou ascogone se trouve inclus dans le protopérithèce. Toutes les études génétiques montrent que l'ascogone ne contient aussi qu'un seul noyau; cet élément reproducteur est, contrairement à la microconidie, très riche en cytoplasme. La fécondation se présente donc chez *Podospora anserina* comme un cas manifeste d'anisogamie. Il est vraisemblable que seul le noyau de la microconidie pénètre dans l'ascogone.

Chaque mycélium + ou — est autostérile, car la fécondation exige toujours l'arrivée d'une microconidie — au contact du trichogyne d'un protopérithèce + ou réciproquement. Les fructifications peuvent être obtenues de deux manières : soit à partir des thalles issus de

spores binucléées normales, hétérocaryotiques pour le signe : les mycéliums portent des organes mâles et femelles de signe + et de signe —; les fructifications obtenues ici correspondent aux deux croisements réciproques ♀+ × ♂— et ♀— × ♂+; soit à partir de l'hybridation de deux thalles homocaryotiques, l'un + et l'autre —. Au cours de la confrontation de deux mycéliums dans une même boîte de culture, les fructifications qui correspondent aux deux croisements réciproques se trouvent mélangées sur la ligne de contact; comme précédemment, il n'est pas possible de les distinguer (fig. 2, *a*). Cependant, certains « artifices génétiques » permettent de séparer ces deux groupes de périthèces : quand l'une des souches est S et l'autre s, les fructifications qui correspondent aux deux croisements réciproques se répartissent en deux lignes parallèles (fig. 2, *b*). Enfin on peut recueillir, en suspension dans un liquide, les microconidies de chacun des deux

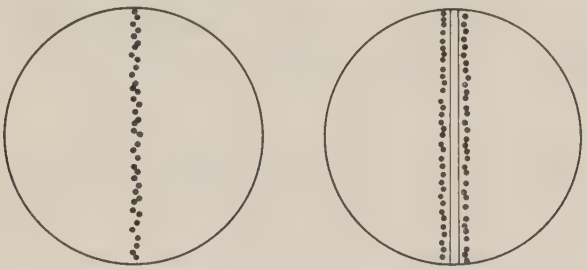


Fig. 2. — Disposition des fructifications dans le cas d'un contact normal *(A)* et d'un barrage *(B)*.

thalles (Monnot, 1953). Cette technique permet de réaliser séparément les deux croisements réciproques : l'apport d'une suspension de microconidies — sur le thalle + et, réciproquement, conduit à un type homogène de fructifications sur une culture, ♀+ × ♂— ou ♀— × ♂+.

B. — LE POLYMORPHISME DES SOUCHES SAUVAGES

Podospora anserina peut être recueilli dans la nature, sur des excréments d'herbivores. Lorsqu'on place ces défécations dans des conditions de température et d'humidité convenables, on observe parfois, au milieu de très nombreuses fructifications d'autres champignons coprophiles, quelques périthèces de *Podospora anserina,* le plus généralement disposés côte à côte. Il est probable que chacun de ces petits groupes de périthèces de *Podospora anserina* provient de la fructification d'un mycélium unique. On peut y prélever des ascospores, les faire germer et obtenir ainsi de nombreuses souches monospores. L'en-

semble des souches issues d'un même groupe de fructifications constitue ce que nous appelons « une souche collective ». Les souches collectives sont conservées sous la forme d'une série de mycéliums homocaryotiques + et —. Actuellement, 14 souches collectives d'origine variée sont réunies dans la collection : les souches A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, s et S (1).

Des expériences nombreuses et variées, réalisées depuis 10 ans par plusieurs chercheurs et par nous-même, ont apporté sur ces souches un certain nombre d'informations intéressantes.

1° L'homogénéité des thalles appartenant à une même souche collective. — Si l'on excepte les mutants apparus spontanément ou obtenus grâce à divers agents mutagènes, les diverses souches monospores appartenant à une même souche collective sont d'une grande homogénéité. Les thalles sont morphologiquement indistinguables. Aucun barrage ne se forme au cours de leur confrontation. La fertilité des croisements est toujours normale et les deux croisements réciproques donnent toujours des résultats identiques.

2° L'hétérogénéité des souches d'origine différente. — Le seul examen morphologique des mycéliums révèle fréquemment des différences, mais faibles et toujours insuffisantes pour atténuer la notion de *type sauvage*. La situation est tout autre lorsqu'on envisage le contact entre mycéliums d'origine différente et la fertilité des croisements entre ces souches.

Lorsqu'on confronte deux de ces souches dans une même boîte de culture il se forme un barrage dans presque tous les cas (seule la confrontation entre les souches s et N fait exception). Dans les cas déjà connus, ces barrages ont toujours pour origine des différences de génotype (Rizet, 1953; Rizet et Esser, 1954). L'existence de ces barrages rend particulièrement aisée l'observation d'anomalies de fertilité puisque, pour chaque confrontation, les périthèces correspondant aux deux croisements réciproques se trouvent topographiquement séparés (fig. 2, *b*).

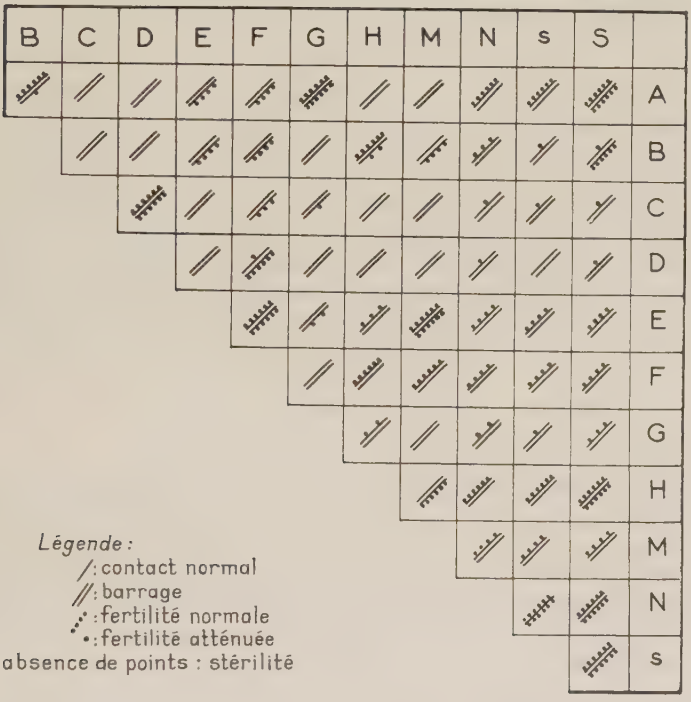
Pour des raisons diverses et à des moments très variés, tous les croisements possibles entre les diverses races ont été réalisés, au moins par confrontation des mycéliums dans les conditions les plus habituelles de culture (sur moût de maïs gélosé et à une température de 25 à 26°). Plusieurs types d'observations résultent de ces expériences préliminaires. Le résultat du croisement ne dépend que de l'origine des souches utilisées; en particulier, il n'est jamais modifié par le signe des parents.

Les fertilités de ces divers croisements sont très différentes. Pour certaines confrontations, la présence de deux lignes très denses de

(1) En réalité les souches S et s appartenaient à l'origine à une même souche collective; l'une d'elles est issue de l'autre à la suite d'une mutation spontanée.

périthèces, de part et d'autre de la zone du barrage, signifie que les deux croisements réciproques sont normalement fertiles. Dans d'autres cas, l'absence d'une ligne de périthèces traduit la stérilité de l'un des deux croisements réciproques; cette situation définit une semi-incompatibilité (RIZET, 1954). Ailleurs, la stérilité est totale sur les deux souches. En dehors de ces situations schématiques, on observe aussi

TABLEAU I. — RÉSULTATS DES CONFRONTATIONS ET DES CROISEMENTS ENTRE SOUCHES D'ORIGINE GÉOGRAPHIQUE DIFFÉRENTE (explications dans le texte).



toute une gamme de résultats plus nuancés : qu'il y ait ou non semi-incompatibilité, le nombre des fructifications formées est extrêmement varié.

Nous avons groupé dans le tableau I l'ensemble des résultats. Sur ce tableau, deux lignes indiquent l'existence d'un barrage : des points plus ou moins nombreux (de 1 à 6) schématisent divers degrés de fertilité; l'absence des points traduit un cas de stérilité comme on le rencontre pour de très nombreuses confrontations. A la lecture de ce tableau, il devient clair que toutes les souches collectives ont des comportements différents. Ajoutées à celles des barrages, ces observations confirment l'idée que toutes les souches collectives sont génétiquement différentes.

En résumé, en dehors du signe, chacune des souches collectives paraît isogénique et toutes les souches collectives sont génétiquement différentes. Ces différences déterminent presque toujours la formation d'un barrage, et parfois des réductions plus ou moins importantes et variées de la fertilité; dans tous les cas connus, ces deux phénomènes correspondent l'un à une incompatibilité cellulaire, l'autre à une incompatibilité sexuelle.

Si l'on rappelle que l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle, pour les cas déjà analysés, relèvent d'un déterminisme génétique commun et relativement simple, il est clair que ce matériel apporte tout un ensemble de situations intéressantes pour l'étude des phénomènes d'incompatibilité.

CHAPITRE II

TECHNIQUES

Les techniques les plus couramment utilisées sont, en ce qui concerne les cultures, le sous-clonage des mycéliums et l'analyse des tétrades, parfaitement connues (Beisson-Schecroun, 1962; Marcou, 1962); nous nous limiterons à en préciser quelques aspects. Nous nous étendrons plus longuement sur les techniques d'obtention des croisements et sur les méthodes utilisées pour évaluer leurs fertilités. Nous donnerons également quelques indications sur certaines techniques microchirurgicales nécessaires à la solution de plusieurs problèmes.

A. — MILIEUX DE CULTURE. MÉTHODES DE PROPAGATION ET D'ÉTUDE DES SOUCHES

Parmi les milieux utilisés, seul le crottin de cheval permet l'accomplissement de la totalité du cycle de *Podospora anserina*. L'examen des barrages et les croisements sont habituellement faits lorsque les thalles sont cultivés sur un moût de maïs gélosé. Si l'on ajoute de l'acétate d'ammonium (6,3 g par litre), on obtient un excellent milieu pour la germination des ascospores.

Les thalles homocaryotiques issus de spores uninucléées, en dehors des repiquages normaux, peuvent être sous-clonés à partir de filaments ou d'articles isolés. Ces deux opérations requièrent l'emploi d'un micromanipulateur. On peut également obtenir des thalles homocaryotiques par dédicaryotisation des mycéliums issus de spores binucléées. Dans un « mixer » le thalle est fragmenté, la suspension est étalée sur milieu gélosé et chaque fragment fournit soit un mycélium hétérocaryotique comme la souche originelle, soit un homocaryon de l'un ou l'autre type. La numération de ces trois catégories de mycéliums permet, en outre, d'évaluer la composition quantitative nucléaire de la souche traitée et de suivre la disparition progressive ou non de certains types de noyaux.

B. — RÉALISATION ET ÉTUDE DES CROISEMENTS

Le résultat d'un croisement obtenu par la confrontation d'un thalle + et d'un thalle — n'est susceptible d'une interprétation que dans les cas de barrage : on voit très bien alors si la stérilité affecte les deux croisements réciproques ou l'un d'eux seulement. Cependant, lorsque la fertilité est visiblement partielle ou normale en apparence, d'autres méthodes sont nécessaires pour apprécier avec une certaine rigueur le degré de fertilité. Les croisements doivent alors être réalisés par spermatisation.

1° Réalisation des croisements par spermatisation.

La souche utilisée comme parent femelle est ensemencée en boîte de Pétri. Sur toute la surface du milieu, plusieurs milliers de protopérithèces se développent en quelques jours. La souche utilisée comme parent mâle est cultivée dans des tubes d'où il est très facile, après adjonction d'eau stérile, de recueillir stérilement une suspension de microconidies. Les éléments mâles et femelles ne se développant d'une manière satisfaisante qu'à la lumière, les cultures sont placées dans une enceinte éclairée lorsque les thalles ont recouvert toute la surface du milieu. Ainsi, des thalles âgés d'une dizaine de jours et préalablement exposés à la lumière à partir du sixième jour sont aptes à la réalisation des spermatisations. A ce moment, la suspension des microconidies est répartie sur le thalle choisi comme parent femelle : 3 à 5 jours plus tard, les fructifications sont mûres.

Cette méthode, qui permet de réaliser séparément les deux croisements réciproques, se prête aussi à toutes sortes de modalités particulièrement intéressantes pour les recherches que nous avons entreprises. La même suspension de microconidies peut être utilisée pour réaliser des croisements variés dont certains peuvent servir de témoins de fertilité pour évaluer comparativement la fertilité des autres. La suspension de microconidies peut être diluée et on peut réaliser des croisements avec des concentrations de microconidies très variées. De cette manière, on peut mesurer la fertilité des thalles femelles en fonction du nombre de microconidies apportées. Il est également possible d'effectuer des fécondations entre protopérithèces et microconidies d'âges divers ou obtenus dans des conditions de milieu différentes.

Cette méthode permet aussi l'obtention de fécondations pratiquement simultanées sur toute la surface de la culture femelle. Les périthèces du thalle évoluent ensuite à la même vitesse. Nous avons aussi pu remarquer, lorsque les cultures fécondées sont placées à 7° C, que les fructifications cessent leur développement : la croissance des péri-

thèces ne reprend que lorsque la température redevient normale. Ainsi, lorsqu'on place, 24 heures après la spermatisation, les cultures femelles à 7°, le développement de tous les périthèces se trouve interrompu au même stade de leur évolution. On peut donc, en faisant varier cet intervalle de temps, prolonger de manière spécifique une phase choisie à l'avance du développement d'un périthèce. Cette technique permet de décomposer les divers stades de l'évolution des périthèces, depuis l'apport des microconidies jusqu'à la formation des asques.

Si l'on utilise des suspensions très diluées de microconidies, on peut obtenir le développement de quelques fructifications ou même d'une seule fructification; on peut alors recueillir tous les asques produits et successivement projetés au fur et à mesure de leur maturation par un même périthèce (parfois plus d'un millier).

Enfin, cette technique peut permettre de suivre avec beaucoup de précision le devenir, après la fécondation, de certains protopérithèces choisis à l'avance. Ceci revient à marquer une petite plage de la culture femelle et à y repérer, par un dessin à la chambre claire, la position des éléments femelles. Après spermatisation, il sera relativement facile de noter les protopérithèces fécondés et de suivre leur évolution individuelle jusqu'à la formation des asques et la maturation des ascospores.

2° Estimation de la fertilité des croisements.

Pour l'étude de la fertilité des croisements, l'élément de départ est constitué par le nombre de périthèces se développant après spermatisation à la surface du thalle utilisé comme parent femelle. Ce nombre de périthèces dépend de trois facteurs : le nombre de protopérithèces aptes à être fécondés, le nombre des microconidies contenues dans la suspension et le coefficient d'aptitude à la fécondation lié aux génotypes des deux parents. Or, ce dernier facteur seul nous intéresse. La difficulté tient au fait que les deux autres facteurs ne peuvent être évalués directement.

Parmi ces deux facteurs, l'un est totalement incontrôlable : le nombre des protopérithèces aptes à être fécondés dans une culture; on peut seulement estimer le nombre total des protopérithèces en dénombrant ceux que l'on rencontre dans une unité de surface de culture femelle. La densité des microconidies ne peut être directement vérifiée, car leur dilution dans les suspensions utilisées est trop faible : en effet, un tube de la culture mâle ne donne guère plus de 10 000 microconidies (ce chiffre étant estimé par une méthode indirecte), alors que le volume de la suspension pour obtenir une répartition homogène des microconidies sur le thalle femelle doit être au minimum de 6 cm^3. Cependant, on peut diluer cette suspension et établir une relation entre le taux de dilution et le nombre des péri-

thèces formés. Jusqu'à plus de 2 000 périthèces la relation est linéaire puis s'infléchit (voir fig. 11, p. 710). On peut donc penser que, jusqu'à cette concentration, chaque microconidie apportée a fertilisé un protopérithèce; ceci est vrai surtout lorsque les organes femelles sont nombreux et uniformément répartis à la surface des cultures.

A défaut d'estimer le nombre des organes mâles et femelles impliqués dans un croisement, nous devons recourir à un certain nombre de techniques expérimentales peu dispendieuses en matériel et susceptibles d'une interprétation statistique simple.

Nous envisagerons ici, et seulement à titre d'exemple, les résultats que l'on peut très rapidement obtenir par la méthode que nous avons le plus couramment utilisée.

a) Application au cas des souches B_1 *et* B_2.

Ces deux souches, isolées dans la descendance du croisement entre les souches collectives s et A, ne diffèrent que par un couple de gènes : B_1 et B_2 sont allèles. Nous désirons savoir si l'interaction entre les gènes B_1 et B_2 a un effet sur la fertilité des croisements, c'est-à-dire si la fertilité des croisements $♀B_1 \times ♂B_2$ et $♀B_2 \times ♂B_1$ est identique ou non à celle des croisements $B_1 \times B_1$ et $B_2 \times B_2$. Pour ce faire, quatre souches sont utilisées : deux souches B_1 (+ et —) et deux souches B_2 (+ et —). Par spermatisation nous pouvons réaliser huit croisements fertiles différents pour lesquels nous comptons les périthèces formés. Le tableau II (A) indique les résultats de cette étude. En fait, par rapport aux gènes B_1 et B_2 nous n'avons réalisé que quatre croisements différents. L'image (B) n'est que la simplification de l'image (A) obtenue en totalisant les résultats des croisements homologues ♀— × ♂+ et ♀+ × ♂—.

Tableau II. — Nombre de périthèces formés dans les croisements $B_1 \times B_1$, $B_2 \times B_2$ et $B_1 \times B_2$

(A)

		$♂B_1$		$♂B_2$	
		+	—	+	—
$♀B_1$	+		839		637
	—	740		771	
$♀B_2$	+		927		687
	—	846		799	

(B)

	$♂B_1$	$♂B_2$
$♀B_1$	1 570	1 408
$♀B_2$	1 773	1 486

Dans le tableau II (B) la variation de la fertilité a trois origines : le nombre de microconidies issues des thalles mâles B_1 et B_2; le nombre des protopérithèces à la surface des thalles femelles B_1 et B_2; enfin, l'interaction spécifique entre thalles mâles et femelles. L'effet d'interaction est calculé en soustrayant de la variation totale des effectifs l'influence des thalles mâles et l'influence des thalles femelles B_1 et B_2; cet effet des thalles mâles et femelles est obtenu en comparant les fertilités totalisées dans le sens des colonnes et des lignes. Dans le tableau II (A), les fertilités des croisements homologues peuvent être considérées, vis-à-vis de l'interaction entre B_1 et B_2 à étudier, comme des répétitions d'un même croisement. Le terme résiduel qui correspond à l'effet de ce facteur sera obtenu en déduisant de la variance totale de ce tableau tous les termes calculés à partir du tableau II (B). Le tableau d'analyse de la variance se décompose ainsi :

Origine de la variation	*Total*	*Effet des mâles*	*Effet des femelles*	*Interaction*	*Terme résiduel*
Valeurs	60 582	26 221	9 248	1 682	23 431
Degrés de liberté	7	1	1	1	4

On voit que la variance du terme d'interaction (1 682) est inférieure à la variance du terme résiduel $\left(\frac{23\,431}{4} = 5\,858\right)$. La fertilité des quatre croisements peut être considérée comme homogène. L'interaction entre les gènes B_1 et B_2 n'a donc aucun effet sur la fertilité.

b) Cas des thalles Cd *et* cD.

Ces deux souches sont également isolées dans la descendance du croisement $s \times A$. Les thalles mâles et femelles sont cultivés et hybridés à la température de 26°. Les résultats de croisements réalisés selon le même schéma que précédemment sont indiqués dans le tableau III (p. 628).

Dans cet exemple, la variance de l'interaction est égale à 102, 152 et celle du terme résiduel à 836. Le rapport des variances, égal à 122, est très nettement significatif (valeur au seuil 1 % de 21,2). L'interaction entre génotypes *Cd* et *cD* a donc un effet sur la fertilité. Il est impossible de savoir par cette méthode si cette interaction se manifeste dans les deux sens des croisements $Cd \times cD$.

Dans le sens $♀cD \times ♂Cd$, la fertilité est visiblement réduite. En sens inverse, la fertilité est comprise entre celle des croisements $Cd \times Cd$ et $cD \times cD$; on peut donc considérer que l'aptitude à la fécondation des

Tableau III. — Nombre de périthèces formés dans les croisements $Cd \times Cd$, $cD \times cD$ et $Cd \times cD$

(A)

		♂*Cd*		♂*cD*	
		+	—	+	—
♀*Cd*	+		658		489
	—	593		454	
♀*cD*	+		86		386
	—	63		359	

(B)

	♂*cD*	♂*Cd*
♀*Cd*	1 251	943
♀*cD*	149	745

croisements ♀*Cd* × ♂*cD* est identique à celle des croisements entre souches de même génotype. La fertilité des croisements ♀*Cd* × ♂*cD* serait alors normale.

On peut aussi estimer le taux de fertilité du croisement réciproque ♀*cD* × ♂*Cd*. Dans l'hypothèse où les quatre croisements auraient une aptitude à la fécondation homogène, les fertilités ne dépendraient que des thalles mâles et femelles impliqués dans les croisements. Le rapport des fertilités des croisements ♀*Cd* × ♂*Cd* et ♀*Cd* × ♂*cD* ne dépend que de la proportion des microconidies *Cd* et *cD* apportées : cette proportion est égale à $\frac{1\,251}{943}$. Cette proportion devrait également s'observer entre les fertilités des croisements ♀*cD* × ♂*Cd* et ♀*cD* × ♂*cD*, si les premiers étaient normalement fertiles, puisque l'on a utilisé les mêmes thalles mâles que dans les deux croisements précédents. Le nombre des périthèces hybrides ♀*cD* × ♂*Cd* serait alors égal à $745 \times \frac{1\,251}{943}$, soit 988. Comme on n'en trouve que 149, la fertilité de ce croisement peut être évaluée à $\frac{149}{988} \times 100$, soit 15 %. Dans le cas de fertilisation des protopérithèces *cD* par des microconidies *Cd*, 15 % seulement des fécondations sont réussies.

L'analyse de ces deux exemples met clairement en évidence les principaux obstacles que nous rencontrerons au cours de l'interprétation des expériences destinées à mesurer d'une manière précise la fertilité des croisements. Ces difficultés sont de deux ordres :

1° Elles concernent tout d'abord la notion de fertilité dans le cas des souches de même génotype. Si l'on se reporte aux tableaux II et III, on constate que les fertilités des croisements entre souches de même génotype sont différentes. On peut évidemment penser que ces écarts de fertilité ont pour simple origine des différences dans la concen-

tration des microconidies contenues dans une suspension de même volume ou des différences dans la densité des protopérithèces. Le rôle de ces facteurs sur la variation de la fertilité des cultures est évident, car on montre que la fertilité relative des croisements réalisés chez *Podospora anserina* dépend toujours de l'âge des cultures mâles et femelles au moment de leur croisement et des conditions externes (richesse du milieu nutritif et température). Cependant, même lorsqu'on limite au maximum l'effet de ces facteurs, on constate que la fertilité n'est jamais rendue homogène. Il faut donc penser que les mycéliums peuvent différer intrinsèquement les uns des autres par leur aptitude à fournir une masse plus ou moins abondante de microconidies et de protopérithèces. C'est vraisemblablement le cas lorsqu'on constate que les fertilités des croisements réalisés entre les thalles d'une même souche collective, donc entre thalles de même génotype, varient d'une souche collective à une autre. En fait, comme ce qui nous intéresse est beaucoup plus précis, nous n'avons pas étudié le déterminisme de ces différences de fertilité. Nous désirons surtout savoir si les fertilités obtenues en croisant deux génotypes résultent ou non d'une interaction entre ces génotypes, modifiant de manière spécifique l'aptitude à la fécondation, ou seulement de propriétés contingentes des souches et étrangères au phénomène étudié, comme leur aptitude à fournir plus ou moins d'organes reproducteurs.

2° L'autre difficulté concerne les approximations qu'entraînent inévitablement des méthodes expérimentales aussi simples. Nous avons en effet admis précédemment, au cours de l'étude du deuxième exemple proposé, que la fertilité du croisement $♀Cd \times ♂cD$ est la même que celle des croisements $Cd \times Cd$ ou $cD \times cD$. Nous montrerons plus loin, par une autre technique expérimentale faisant intervenir une troisième souche de génotype *cd*, que la fertilité du croisement $♀Cd \times ♂cD$ est réellement normale (p. 644). Enfin d'autres méthodes, plus spécialement adaptées à l'étude des mécanismes d'incompatibilité qui conduisent à des fertilités atténuées, seront envisagées au cours du chapitre consacré à l'étude de l'incompatibilité sexuelle (p. 710).

C. — TECHNIQUES MICROCHIRURGICALES

Nous avons utilisé le micromanipulateur de Fombrune (de Fombrune, 1949). Les techniques que nous avons le plus couramment utilisées ont déjà été adaptées à des études sur cet organisme (Beisson-Schecroun, 1962; Marcou, 1962). Nous nous limiterons à un bref rappel.

Les thalles sont maintenus en goutte pendante à l'intérieur de chambres à huile. Les mycéliums que l'on y cultive peuvent être obtenus soit à partir de fragments mycéliens, soit à partir de la germination des spores.

Dans le premier cas, les fragments d'un thalle cultivé sur milieu gélosé sont disposés dans une goutte de milieu liquide; leur croissance donne des hyphes qui sont individuellement repiquées dans des microgouttes distinctes. On peut, en réglant la forme de la goutte et la quantité de milieu, obtenir des filaments qui émettent peu de ramifications et s'allongent dans des directions choisies à l'avance. Lorsqu'on désire limiter la croissance d'une hyphe, il suffit de ramener les deux extrémités bout à bout afin qu'elles s'anastomosent. Cette opération accélère assez souvent l'émission des rameaux secondaires; on peut interrompre la croissance des hyphes latérales en les accolant au filament principal avec lequel elles confluent.

Les spores germent aisément dans les microgouttes lorsqu'on incorpore de l'acétate d'ammonium au milieu de culture. On peut également obtenir leur germination dans le milieu maïs standard lorsque, avant de les disposer dans la microgoutte, on les trempe une heure et demie à 40° dans du jus de crottin stérilisé.

Les cultures ainsi obtenues peuvent être sous-clonées soit à partir d'hyphes, soit à partir d'articles que l'on transporte dans de nouvelles microgouttes. La manipulation des articles reste, malgré toutes les précautions, délicate. Afin d'assurer la survie de l'article isolé, il importe en effet d'éviter les pertes trop importantes de protoplasme au moment de la section des hyphes; pour cela on provoque l'obturation des cloisons avant l'isolement de l'article en faisant subir à l'hyphe une série de pressions très légères.

L'obtention d'anastomoses, qui constitue l'objet essentiel de nos manipulations, peut être réalisée de diverses manières. Lorsqu'il s'agit de deux hyphes, on les dispose côte à côte dans la même microgoutte de telle manière que la croissance de l'une l'amène au contact de l'autre. Pour les anastomoses faisant intervenir des articles, on dépose l'article contre la paroi de l'hyphe ou l'on juxtapose bout à bout les deux articles à confronter. Lorsqu'on désire anastomoser de très jeunes thalles, deux spores sont déposées dans la même microgoutte; 2 heures après la germination des spores, les thalles sont rapprochés hyphe contre hyphe (Pl. I, *D*).

Lorsqu'on souhaite effectuer une expérimentation dans des conditions précises de température, microscope et micromanipulateur sont réunis dans une cage isotherme à parois transparentes.

Enfin, d'autres techniques, d'emploi plus limité, seront décrites en même temps que les expériences au cours desquelles nous les avons utilisées.

DEUXIÈME PARTIE

DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE L'INCOMPATIBILITÉ ENTRE LES SOUCHES D'ORIGINE GÉOGRAPHIQUE DIFFÉRENTE

Notre étude concerne l'analyse des facteurs génétiques gouvernant les relations entre six souches collectives : s, A, B, E, F, et S. Un premier cas, celui de l'incompatibilité entre souches s et A, a fait l'objet d'une étude détaillée. Cette étude a permis de mettre au point une méthodologie, de relever et d'analyser les divers aspects de l'incompatibilité et d'établir que tous ces aspects peuvent être la conséquence d'un mécanisme unique et simple. Ceci étant établi, il devient possible de mettre en évidence, beaucoup plus rapidement, les mécanismes intervenant entre les autres souches.

CHAPITRE PREMIER

INCOMPATIBILITÉ ENTRE LES SOUCHES s ET A

A. — LES MANIFESTATIONS DE L'INCOMPATIBILITÉ

1° Entre un thalle s et un thalle A de signe quelconque, il y a toujours barrage.

2° Dans une confrontation entre souches de signe contraire, les périthèces se répartissent en une seule ligne très dense sur la souche s. Le croisement ♀*A* × ♂*s* est donc stérile et la fertilité du croisement réciproque paraît normale. Les résultats des croisements réalisés par spermatisation confirment la stérilité du croisement ♀A × ♂s et montrent que la fertilité du croisement ♀s × ♂A, comprise entre celle des croisements s × s et A × A, peut être considérée comme normale. Il s'agit donc, selon toute apparence, d'un cas typique de semi-incompatibilité.

3° Le croisement fertile ♀s × ♂A montre des anomalies. Près de la moitié des asques tétrasporés contiennent une ou deux spores binucléées de taille réduite (Pl. I, *E*). Lorsqu'un asque contient deux spores anormales, elles sont toujours dans la même moitié d'asque. Cette anomalie n'apparaît ni dans les croisements s × s, ni dans les croisements A × A. Elle résulte donc d'une interaction entre les génotypes des parents.

Nous envisagerons successivement le déterminisme génétique de la formation du barrage entre souches s et A, puis celui de la semi-incompatibilité et de l'anomalie de la taille des spores.

B. — DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA FORMATION DU BARRAGE

1° Les divers types de souches homocaryotiques issues du croisement s × A.

A partir de spores uninucléées issues du croisement ♀s × ♂A nous avons obtenu plusieurs centaines de souches F_1 homocaryotiques. Ces souches se classent en deux catégories très distinctes. Certaines croissent normalement comme les parents; les autres sont anormales : leur croissance est très lente, des articles morts de plus en plus nombreux apparaissent au centre de la culture, ce phénomène se généralisant graduellement au fur et à mesure que les cultures vieillissent. Seules, les souches à croissance normale peuvent être confrontées ou croisées.

a) Etablissement des catégories phénotypiques.

Pour connaître le nombre de phénotypes F_1 nous avons opéré en trois temps. 1° Les confrontations des souches F_1 avec les parents s et A permettent de classer ces souches en trois catégories : certaines donnent barrage avec s et A, d'autres montrent un contact normal avec l'un des parents (s ou A) et un barrage avec l'autre. Plusieurs couples de gènes paraissent donc impliqués dans la formation du barrage entre souches s et A. 2° La confrontation deux à deux de plus de 50 souches F_1 permet de les répartir en six types distincts, chaque type comprenant les souches qui présentent le même spectre de réactions (barrage ou contact normal). 3° Nous avons ensuite confronté avec un représentant de chaque type le restant des souches F_1. Toutes rentrent dans l'une ou l'autre des six catégories précédemment reconnues.

Toutes ces observations sont réunies dans le tableau IV (p. 634) où l'on a mentionné également les nombres des souches correspondant à chaque type ainsi que le nombre des souches F_1 à croissance anormale.

On constate que deux des types, 1 et 6, ont le même comportement que les souches parentales s et A, mais l'un d'eux, le type 6, a une fréquence telle qu'il correspond manifestement à plusieurs génotypes. On remarque que des barrages se produisent toujours lorsqu'on confronte une souche de type 1, 2 ou 3 avec une souche de type 4, 5 et 6. Une symétrie est nettement visible entre ces deux sous-groupes : entre souches de type 1, 2 et 3 ou entre souches de type 4, 5 et 6 un seul barrage se produit (entre 1 et 3 d'une part, et entre 4 et 6 d'autre part); il y a donc analogie de comportement entre le type 2, qui ne

donne barrage ni avec 1, ni avec 3, et le type 5 qui ne donne barrage ni avec 4, ni avec 6. Enfin, la rareté des souches correspondant aux types 2 et 4 ne peut être qu'une manifestation de linkage.

Tableau IV. — Résultats des confrontations entre les souches F_1 du croisement s × A

Types de souches F_1		1 ou *s*	2	3	4	5	6 ou *A*	Nombres observés
Croissance normale.	1	N	N	B	B	B	B	49
	2	N	N	N	B	B	B	9
	3	B	N	N	B	B	B	24
	4	B	B	B	N	N	B	6
	5	B	B	B	N	N	N	56
	6	B	B	B	B	N	N	132
Croissance anormale.								177

Légende : N correspond à un contact normal et B à un barrage.

b) Analyse des croisements $F_1 \times F_1$.

Des informations plus précises sur les souches F_1 sont apportées par l'analyse de croisements $F_1 \times F_1$. Ces souches diffèrent souvent les unes des autres par un petit nombre de gènes et les résultats sont plus faciles à interpréter.

1° Résultats du croisement entre souches de type 2 et 5. — Les spores uninucléées issues de ce croisement donnent avec une égale probabilité deux sortes de souches : les unes donnent barrage seulement avec le parent 2, les autres seulement avec le parent 5.

Les souches de type 2 et de type 5 ne diffèrent donc que par un seul couple de gènes que nous appellerons B_1 et B_2. Un barrage se produit entre deux souches chaque fois que l'une est B_1 et l'autre B_2. Si nous affectons le gène B_1 aux souches de type 2, l'absence d'un barrage entre ces souches et les souches de type 1 (ou la souche s) et 3, indique que ces dernières sont également B_1. La souche de type 5 étant B_2, il en est de même des types 4 et 6 et de la souche A.

L'analyse des tétrades issues du croisement 2 × 5 montre que 90 % des asques environ sont pré-réduits. Le locus B est proche du centro-

mère, à une distance de l'ordre de cinq unités. Les spores binucléées des asques pré-réduits donnent des mycéliums normaux : B_1 pour un demi-asque, B_2 pour l'autre. Dans le cas de post-réduction, chaque spore binucléée ($B_1 + B_2$) fournit un mycélium à croissance anormale et comprenant des articles morts. Au cours de leur évolution, ces mycéliums se séparent en secteurs à croissance normale, délimités par des zones dépigmentées. L'existence de ces secteurs, homocaryotiques pour B_1 ou pour B_2, traduit la séparation des noyaux correspondants.

L'interaction B_1B_2 est donc responsable à la fois du barrage entre un thalle B_1 et un thalle B_2 et du caractère anormal et instable des hétérocaryotes $B_1 + B_2$: les zones dépigmentées des mycéliums hétérocaryotiques correspondent à des barrages entre secteurs B_1 et B_2.

*2° **Résultats des croisements entre types 1 et 2.*** — Là encore un seul couple de gènes, que nous appellerons *Cc*, est en jeu. Les souches homocaryotiques issues de ces croisements sont, avec des fréquences égales, de type 1 et de type 2. Les asques post-réduits sont rares (moins de 2 %) : le locus C est donc très voisin du centromère (une unité environ). Les hétérocaryons $C + c$ issus des spores binucléées des asques post-réduits sont stables et de même phénotype que le parent 1. C'est pourquoi nous avons attribué le symbole C à l'allèle présent dans la souche 1 (ou s). Le gène *c* a évidemment pour origine la souche A.

*3° **Résultats des croisements entre 1 et 5.*** — Nous savons que les souches de type 1 portent les gènes B_1 et *C*, et les souches de type 5 le gène B_2. Les croisements 1 × 5 fournissent quatre sortes de souches filles homocaryotiques, ce qui implique une différence entre le type 1 et le type 5 portant sur deux couples de gènes dont l'un est évidemment B_1B_2 : les deux types parentaux 1 et 5 et les deux types recombinés ayant la même expression phénotypique que les souches F_1 de type 2 et 4. Le deuxième couple de gènes est donc *Cc*. Nous avons donc les génotypes partiels de quatre souches F_1 : B_1C, B_1c, B_2C et B_2c correspondant aux types 1, 2, 4 et 5.

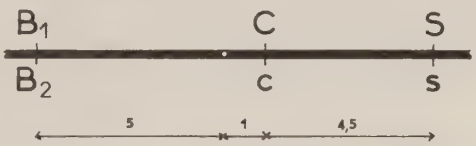


Fig. 3. — Localisation des loci B, C et S.

La rareté des types recombinés B_1c et B_2C montre que les couples B_1B_2 et *Cc* sont liés. L'analyse des tétrades précise que ces deux loci sont situés de part et d'autre du centromère. Ajoutons que l'analyse de croisements intéressant soit le couple *Cc*, soit le couple B_1B_2, en même temps que le couple *Ss* déjà connu (Rizet, 1952), montre qu'ils appartiennent tous trois au même groupe de linkage. Le locus S voisin du centromère est situé du même côté que le locus C (1).

(1) Les distances calculées dépendent beaucoup de la température : nous indiquons ici des valeurs moyennes.

4° Résultats des croisements entre types 4 et 6. — Nous savons déjà que les souches de type 4 portent les gènes B_2 et *C* et que le type 6 est B_2. Entre ces souches, le barrage est dû à une interaction entre le gène *C* et un gène non allèle de *C* porté par la souche de type 6. D'autre part, le type 6 comprend plusieurs génotypes. Afin de les identifier, nous avons croisé un certain nombre de souches de type 6 aux souches de type 4. L'analyse de la descendance de ces croisements permet de les classer en trois groupes.

1° Les croisements du premier groupe donnent quatre sortes de souches homocaryotiques F_1 de même fréquence : des souches de type parental (4 et 6), et des souches de type recombiné dont l'une, à croissance normale, ne donne barrage avec aucun parent (donc identique aux souches F_1 de type 5) et l'autre à croissance très faible où de nombreux articles meurent rapidement. Il s'agit donc de croisements impliquant deux couples de gènes. L'analyse des tétrades confirme cette interprétation et montre que l'un d'eux est pratiquement toujours pré-réduit et l'autre post-réduit dans plus de 80 % des cas.

Le premier couple est *Cc*, ce qui est confirmé également par le fait que le type recombiné à croissance normale a le même phénotype que la souche F_1 de type 5 qui porte *c*. Nous appellerons *Dd* le second couple impliqué dans ce croisement et réservons la lettre D pour le gène responsable, avec le gène *C*, du barrage entre souches de type 4 et 6.

Ceci conduit, pour les souches F_1 de type 4, 5 et 6, aux génotypes *Cd*, *cd* et *cD*. Les souches à croissance normale issues du croisement 4×6 (ou $Cd \times cD$) sont *CD*. On voit que le caractère anormal de ces souches et le barrage entre souches de types 4 et 6 résultent de la même interaction entre *C* et *D*.

En résumé, et compte tenu de ce qui a été mis précédemment en évidence, on peut affecter respectivement aux souches 4 et 5 et aux souches 6 impliquées dans ces croisements les génotypes B_2Cd, B_2cd et B_2cD.

2° Les croisements du deuxième groupe donnent des résultats analogues aux précédents : quatre sortes de souches filles homocaryotiques de fréquences égales. On retrouve les deux types parentaux, des souches ne donnant de barrage avec aucun des parents et des souches à croissance très lente montrant rapidement de nombreux articles morts. Il s'agit donc encore de croisements mettant en jeu deux couples de gènes indépendants. L'analyse de tétrades révèle que l'un des couples est pratiquement toujours pré-réduit et l'autre post-réduit dans 17 % des cas environ; le premier est *Cc*, le deuxième ne peut pas être *Dd* : il s'agit d'un nouveau couple que nous appellerons *Ee*. La différence entre les souches parentales ne portant que sur deux couples de gènes, les souches de type 6 utilisées dans ces croisements portent, au locus D, l'allèle *d*.

Ainsi dans ces croisements, comme dans les précédents, le barrage

est provoqué par l'interaction de deux gènes non allèles *C* et *E*, les deux allèles *c* et *e* ne manifestant aucune interaction décelable.

Ces résultats impliquent que l'allèle *E* est présent dans la souche collective A, dont le génotype est alors B_2cDE, la souche s étant B_1Cde.

Les résultats des croisements entre types 4 et 6 précédemment envisagés montrent qu'une partie des souches de type 6 sont *cDe* ou *cdE*. A priori, rien ne s'oppose à l'existence de souches F_1 à croissance normale de même formule que la souche A, c'est-à-dire B_2cDE, qui rentreraient également dans le type 6. Ces souches contiennent deux gènes, *E* et *D*, responsables de barrage avec le gène *C* des souches de type 4.

3° Effectivement, certains croisements entre souches de type 4 et certaines souches de type 6 donnent une descendance complexe impliquant la ségrégation des trois couples de gènes *Cc*, *Dd* et *Ee* et l'existence de souches filles à croissance réduite correspondant aux génotypes *CDe*, *CdE* et *CDE*.

c) Conclusions.

L'analyse qui précède nous a montré que les différences entre les souches s et A portaient au moins sur quatre couples de gènes, la souche s étant B_1Cde, la souche A, B_2cDE. Le croisement s × A doit donc fournir des souches F_1 appartenant au moins à 16 génotypes. L'étude des croisements entre quelques types de souches F_1 nous a montré que les confrontations entre souches ne différant que par un seul ou deux couples de gènes pouvaient également conduire à des barrages. Nous avons vu qu'un barrage se produisait entre deux souches dont l'une était B_1 et l'autre B_2; qu'un barrage se produisait entre une souche *Cde* et des souches *cDe*, *cdE* ou *cDE*. Par ailleurs, pour les couples *Cc*, *Dd* et *Ee*, les résultats obtenus ne se comprennent que si les allèles *C*, *D* et *E* sont seuls « efficaces ».

Les résultats de divers croisements nous ont aussi permis d'établir les formules d'un certain nombre de types de souches F_1. Les souches de type 4 et 5 sont respectivement B_2Cde et B_2cde, le type 6 correspond à trois génotypes différents, B_2cDe, B_2cdE et B_2cDE; enfin, le type 1 est B_1Cde. Le type 2 porte les gènes B_1 et *c*; comme il ne diffère du type 5 que pour le gène B_2, il contient comme lui les gènes *d* et *e* : son génotype est donc B_1cde.

Dans le cas des descendants F_2 analysés, les souches portant les gènes *C* et *D* ou *C* et *E* ou *C*, *D* et *E* sont anormales et manifestent une croissance réduite. Si ces génotypes correspondent toujours à des souches à croissance anormale, celles-ci doivent correspondre à six génotypes F_1 puisqu'en dehors des gènes déjà cités ces souches peuvent être B_1 ou B_2.

Ainsi, trois génotypes seulement (B_1cDe, B_1cdE et B_1cDE) n'ont pas été identifiés et seules les souches F_1 du type 3 n'ont pas été utilisées dans les croisements. D'après les hypothèses formulées plus haut, les souches correspondant à ces trois génotypes doivent avoir le même

comportement en ce qui concerne la formation de barrage : barrage avec les souches portant B_2 (types 4, 5 et 6) ou C (type 1) et contact normal avec les souches de type 2 (B_1cde). C'est précisément le comportement des souches de type 3. On est donc en droit d'admettre que ce type correspond, comme le type 6, à trois génotypes.

Il devient possible de construire un tableau (tableau V) analogue au tableau IV, où les divers types de souches F_1 sont remplacés par leur génotype et dans lequel la nature des contacts sera déduite des trois interactions postulées pour le déterminisme d'un barrage.

Tableau V. — Génotypes des souches F_1 du croisement s × A

	Type	1 (s)	2	3	4	5	6 (A)	Nombres observés
	Génotype	B_1Cde	B_1cde	B_1cDe B_1cdE B_1cDE	B_2Cde	B_2cde	B_2cDe B_2cdE B_2cDE	
1	B_1Cde	—						49
2	B_1cde	N	—					9
3	B_1cDe B_1cdE B_1cDE	B	N	—				24
4	B_2Cde	B	B	B	—			6
5	B_2cde	B	B	B	N	—		56
6	B_2cDe B_2cdE B_2cDE	B	B	B	B	N	—	132
	B_1CDe B_1CdE B_1CDE B_2CDe B_2CdE B_2CDE	Souches à croissance anormale.						177

Légende : Comme pour le tableau IV.

On voit que ce tableau se superpose exactement au tableau IV, ce qui revient à dire que les hypothèses formulées rendent compte, au moins qualitativement, de la totalité des observations. L'identité se confirme si l'on envisage aussi les résultats quantitatifs contenus dans les deux tableaux. La liaison étroite entre les couples B_1B_2 et Cc explique la rareté des souches F_1 B_1c et B_2C. On comprend ainsi la fréquence très réduite des types 2 et 4 et la fréquence relativement faible du type 3 qui correspond cependant à trois génotypes différents. Il est d'ailleurs significatif que la fréquence du type 3 est environ trois fois plus élevée

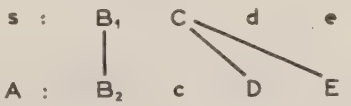
que celle du type 2 ou du type 4. On comprend aussi les fréquences égales et relativement importantes des types 1 et 5. La fréquence élevée du type 6, correspondant à trois génotypes ayant en commun les gènes B_2 et *c*, est tout à fait conforme aux hypothèses. Le fait que les souches à croissance anormale (177 sur un total de 453) représentent très sensiblement les 3/8 de la distribution s'explique : trois des génotypes sont B_1C (types parentaux), les trois autres (B_2C) sont recombinés.

En résumé, les résultats acquis sont les suivants :

1° En ce qui concerne la formation des barrages, les souches parentales s et A diffèrent pour quatre couples de gènes que nous avons appelés B_1B_2, *Cc, Dd, Ee.* Trois de ces couples (*Cc, Dd* et *Ee*) sont indépendants. Les loci correspondant aux couples B_1B_2 et *Cc* sont portés par un même chromosome et situés de part et d'autre du centromère, à une distance de six unités environ.

2° Des barrages se forment entre deux souches chaque fois que l'une est B_1 et l'autre B_2, ou que l'une est *C* et l'autre *D, E* ou *DE.* Dans chaque cas, deux gènes seulement sont impliqués, qui peuvent être allèles (B_1 et B_2) ou non allèles. Dans ce dernier cas (couples *Cc, Dd* et *Ee*), l'un des allèles seulement de chaque couple (*C, D* et *E*) paraît jouer un rôle dans le déterminisme du barrage.

3° Le barrage entre les souches s et A résulte de la superposition de trois systèmes élémentaires dont chacun suffit à le provoquer. Le schéma suivant (où un tiret relie les deux gènes de chacun de ces trois systèmes) résume cette situation :



4° Le caractère anormal d'une souche (instabilité ou croissance réduite) dépend des mêmes gènes que les barrages. Les gènes B_1 et B_2 provoquent l'instabilité des hétérocaryons $B_1 + B_2$. Les noyaux des autres souches à croissance réduite portent toujours les associations *CD, CE* ou *CDE.* Dans la mesure où le barrage est une manifestation d'incompatibilité (Rizet et Schecroun, 1959), ces anomalies des souches F_1 se présentent comme une autre manifestation de ce phénomène.

2° *Propriétés de quelques hétérocaryons.*

Au cours de cette analyse génétique, nous avons étudié également divers hétérocaryons obtenus à partir de spores binucléées normales. Un certain nombre de ces hétérocaryons, qui peuvent contenir soit un, soit deux gènes d'un système élémentaire de barrage, manifestent des particularités intéressantes.

a) Cas d'hétérocaryons ne contenant qu'un gène d'incompatibilité.

Les thalles hétérocaryotiques, *cdE* + *cde* par exemple, peuvent servir de cas témoin. Ces thalles à croissance normale ont le phénotype [E] et font barrage avec une souche *C*. Si les deux noyaux sont de signe contraire, les fructifications se développent régulièrement sur toute la surface de la culture, comme chez les homocaryons *E* + *E* ou *e* + *e*.

Il n'en est pas de même pour les souches *cDe* + *cde* (ou *D* + *d*). Les fructifications n'apparaissent que dans certains secteurs des cultures. Les secteurs sans fructifications correspondent à des zones homocaryotiques *cde*, très rarement à des zones *cDe*. Les fructifications sont limitées aux régions demeurées hétérocaryotiques ou aux frontières d'un secteur *D* et d'un secteur *d*. Dans ces périthèces, la ségrégation *D* — *d* est normale.

Il se produit donc une élimination partielle du noyau *D*. Cette élimination commence très tôt après la germination des spores, comme on peut le constater dans les cultures en goutte pendante. Les hyphes secondaires, généralement homocaryotiques, qui se forment, environ 10 heures après la germination, à partir des grosses hyphes primaires toujours hétérocaryotiques, sont bien plus souvent *d* que *D*. Si la proportion des deux types d'hyphes secondaires homocaryotiques reflète la fréquence des deux types nucléaires dans les filaments hétérocaryotiques, cela signifie que la sélection des noyaux *d* a commencé bien avant la dixième heure.

b) Cas d'hétérocaryons contenant les deux gènes d'un système d'incompatibilité.

Chacun des deux gènes antagonistes peut être porté par un noyau différent; c'est le cas des hétérocaryons *cDe* + *Cde* (*D* + *C*) ou *cdE* + *Cde* (*C* + *E*). Ces souches évoluent de la même manière que les hétérocaryons $B_1 + B_2$. Les jeunes mycéliums ont une croissance anormale et comportent de nombreux articles morts. Les cultures plus âgées montrent des secteurs d'aspect normal délimités par des zones dépigmentées qui correspondent à un barrage. Ces anomalies s'expliquent par le fait que les secteurs sont homocaryotiques *D* ou *C* dans le premier cas, *E* ou *C* dans le second. Les fructifications, qui se localisent de part et d'autre des lignes de barrage, donnent la même descendance que les croisements *C* × *D* ou *C* × *E*.

Dans d'autres hétérocaryons, l'un des noyaux réunit les deux gènes antagonistes et l'autre n'en a qu'un ou pas du tout. C'est le cas des souches *CDe* + *Cde* et *CDe* + *cde*, ou *CdE* + *Cde* (les hétérocaryons *CdE* + *cde*, fort rares, n'ont pas été étudiés). Comme dans les cas précédents, les jeunes thalles ont une croissance anormale et de nombreux articles meurent. Par contre, les thalles plus âgés paraissent nor-

maux, sauf en ce qui concerne la répartition des fructifications, qui sont limitées au centre de la culture. En dehors de cette zone centrale, le mycélium est homocaryotique, de génotype *cde* pour les souches originellement *CDe* + *cde*, et *Cde* pour les souches *CDe* + *Cde* et *CdE* + *Cde*. Les noyaux *CDe* et *CdE* subissent donc une élimination.

La présence de fructifications au centre de la culture indique que des noyaux *CDe* et *CdE* subsistent dans cette région; cependant, dans les tétrades isolées de ces fructifications, on ne trouve aucun descendant de phénotype [D] ou [E]. Ce phénomène sera étudié plus en détail dans la troisième partie.

En résumé, l'étude des hétérocaryons fournit de nouvelles situations qui pourront être exploitées pour analyser le mécanisme de l'interaction entre les gènes d'un système élémentaire de barrage. Cette étude révèle, d'autre part, de nouvelles particularités de ces interactions : par exemple, la disparition des phénotypes [D] et [E] dans la descendance des fructifications *CE* + *Ce* ou *CD* + *Cd*. Enfin, l'étude de ces souches confirme le caractère amorphe des allèles *c*, *d* et *e* vis-à-vis des barrages déterminés par les gènes *C*, *D* et *E*. Cependant, cet état amorphe est relatif puisque l'interaction *D* + *d* entraîne une contre-sélection des noyaux *D*.

C. — DÉTERMINISME DE LA SEMI-INCOMPATIBILITÉ DES CROISEMENTS s × A

L'étude de l'incompatibilité entre souches s et M (Rizet, 1953; Rizet et Esser, 1954), dont la confrontation donne un barrage et qui sont semi-incompatibles, a montré que la stérilité du croisement ♀M × ♂s n'est qu'une autre manifestation des interactions entre gènes responsables de barrages. On pouvait se demander si, dans les cas des souches s et A, la stérilité du croisement ♀A × ♂s ne résultait pas elle aussi soit d'une interaction entre les gènes B_1 et B_2, *C* et *D* ou *C* et *E*, soit de la superposition de plusieurs de ces interactions.

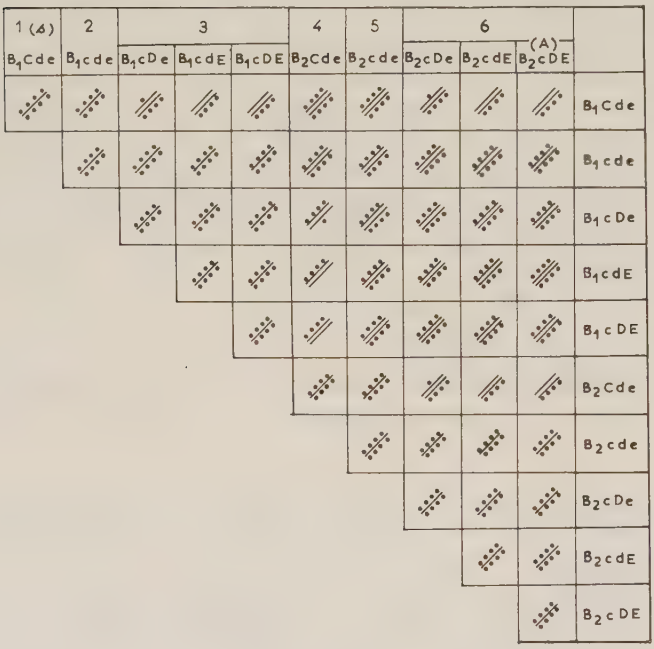
Nous avons donc recherché si on retrouvait cette semi-incompatibilité dans les confrontations entre les souches F_1 issues du croisement s × A.

1° Etude des fertilités dans les croisements entre les souches F_1.

Dans des conditions de milieu données, la fertilité d'une confrontation dépend uniquement du génotype des deux souches. Lorsque aucun barrage ne se produit, c'est le cas en particulier lorsque les deux souches ont le même génotype, la fertilité paraît toujours normale

(ligne dense et continue de périthèces au contact des deux souches). Lorsqu'il y a barrage, on aboutit à l'une des trois situations suivantes : 1° fertilité normale des deux croisements réciproques (ligne continue de périthèces de chaque côté du barrage) ; 2° semi-incompatibilité identique à celle du croisement entre les souches parentales s et A ; 3° fertilité normale de l'un des deux croisements réciproques et fertilité très variable de l'autre en fonction de la température. Dans ce dernier cas, la fertilité est apparemment normale à 32°, nulle à 20° ou au-dessous ;

Tableau VI. — Résultats des confrontations et des croisements entre souches F_1 du croisement s × A.



entre ces deux extrêmes, la fertilité varie : elle est d'autant plus grande que la température est plus élevée.

Le tableau VI schématise les résultats de tous les croisements possibles entre les souches F_1 à 25°. Il y a semi-incompatibilité dans tous les cas où les deux souches confrontées sont l'une *C* et l'autre *E* ; la stérilité correspond alors toujours au croisement ♀*E* × ♂*C*. Tous les cas de fertilité variable avec la température correspondent aux confrontations pour lesquelles une souche est *C* et l'autre *D* ; la réciproque n'est pas vraie lorsque la souche *D* porte également le gène *E* : dans ce cas, l'interaction entre les gènes *C* et *E* conduit à la stérilité totale de l'un des croisements.

Ainsi deux des interactions déjà responsables des barrages élémentaires entre souches s et A (il s'agit des interactions *CE* et *CD*) sont

également responsables de toutes les anomalies de fertilité observées. Ces deux interactions permettent également de rendre compte de la stérilité du croisement ♀A × ♂s. L'interaction entre les gènes B_1 et B_2 ne joue aucun rôle. Le fait que la souche s porte le gène *C* et la souche A le gène *D* pourrait conduire à une fertilité variable avec la température du croisement ♀A × ♂s, mais ce croisement est rendu complètement stérile par l'interaction entre le gène *C* et le gène *E*.

2° Degrés de fertilité de divers croisements réalisés par spermatisation.

Les croisements $C \times D$ et $C \times E$ montrent une dissymétrie nette : dans le sens ♀C × ♂D et ♀C × ♂E, la fertilité est élevée et indépendante de la température, tandis que le croisement ♀D × ♂C a une fertilité variable en fonction de la température. Les interactions *CD* et *CE* ne se manifestent apparemment que dans un seul sens et, dans le cas du croisement $B_1 \times B_2$, normalement fertile dans les deux sens, l'interaction entre ces deux gènes ne se manifeste pas du tout. Pour s'assurer qu'il en est vraiment ainsi, il importe de savoir si la fertilité des croisements $B_1 \times B_2$, ♀C × ♂D et ♀C × ♂E est vraiment normale. Seuls des croisements réalisés par spermatisation permettent de comparer avec précision le degré de fertilité de ces croisements à celle de croisements témoins ($D \times D$ ou $B_1 \times B_1$ par exemple).

a) La fertilité des croisements $B_1 \times B_2$.

Parmi les souches F_1 issues du croisement s × A, on peut isoler des souches B_1 et B_2 portant les mêmes gènes aux loci C, D et E, par exemple des souches B_1cde et B_2cde. Si l'on croise ces souches de toutes les manières possibles, on obtient quatre types de croisements : $B_2 \times B_2$, ♀B_1 × ♂B_2, ♀B_2 × ♂B_1 et $B_1 \times B_1$. Si l'interaction entre les gènes B_1 et B_2 n'a aucune répercussion sur la fertilité, la fertilité des croisements $B_1 \times B_2$ ne doit pas être différente de celle des croisements $B_1 \times B_1$ ou $B_2 \times B_2$. Cette comparaison, effectuée par la méthode décrite plus haut (cf. première partie, p. 626), dans le cas précis des gènes B_1 et B_2, nous a montré que l'interaction entre ces gènes n'avait aucun effet sur la fertilité.

b) La fertilité des croisements ♀C × ♂E *et* ♀C × ♂D.

Pour étudier la fertilité de ces croisements, on doit utiliser une méthode différente, puisque nous savons que les croisements réciproques ♀E × ♂C et ♀D × ♂C sont, l'un stérile et l'autre à fertilité variable avec la température. Le principe revient à inclure les croi-

sements ♀*C* × ♂*E* et ♀*C* × ♂*D* dans une série d'expériences comportant de nombreux croisements réalisés entre souches de même génotype et à comparer la fertilité de tous ces croisements. Nous avons choisi une souche + et une souche — appartenant aux quatre génotypes suivants : *Cde, cde, cDe* et *cdE*. Nous avons effectué à 28° tous les croisements ♀— × ♂+, chaque croisement étant réalisé en triple exemplaire, et nous avons dénombré les périthèces sur chaque culture. Les résultats sont consignés dans le tableau VII.

Tableau VII. — Comparaison de la fertilité des croisements entre souches *C* et *D* et souches *C* et *E*

		♂+			
		Cde	*cde*	*cDe*	*cdE*
♀—	*Cde*	1 161 1 222 1 286	1 437 1 468 1 522	1 264 1 324 1 373	1 185 1 260 1 301
	cde	993 1 021 1 110	1 310 1 372 1 413	1 225 1 279 1 355	1 128 1 171 1 257
	cDe	287 329 342	1 124 1 215 1 245	1 158 1 193 1 219	1 045 1 142 1 243
	cdE	0 0 0	1 520 1 541 1 604	1 340 1 412 1 461	1 191 1 298 1 339

Les croisements ♀*cdE* × ♂*Cde* (ou ♀*E* × ♂*C*) et ♀*cDe* × ♂*Cde* (ou ♀*D* × ♂*C*) sont, l'un stérile, l'autre à fertilité partielle, comme dans le cas de croisements réalisés par confrontation.

Mais d'après les hypothèses formulées plus haut, les degrés de fertilité des 14 autres croisements doivent être identiques. Ces croisements se répartissent en deux ensembles : le premier (1) comprend les résultats impliquant les souches *Cde* et *cde* comme parent femelle (moitié supérieure du tableau), et le second (2) les résultats relatifs aux trois souches mâles, *cde, cDe* et *cdE* (partie droite du tableau comprenant 12 croisements).

Si l'aptitude à la fécondation est homogène dans ces deux groupes, la variance du terme qui la représente ne doit pas être significativement différente de celle du terme résiduel, obtenu en comparant les fertilités des répétitions de chacun des croisements. Bien entendu, il est nécessaire, pour calculer ce dernier terme, de déduire de la variance totale les variances représentant l'aptitude à la fécondation et

l'influence des thalles mâles et femelles utilisés au cours de cette expérience.

Le rapport des variances du terme aptitude à la fécondation et du terme résiduel est de 1,83 pour l'ensemble (1) et de 2,07 pour l'ensemble (2). Aucun de ces rapports n'a une valeur significative (limites respectives au seuil 5 % de 3,24 et 2,51).

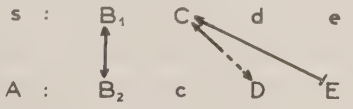
L'aptitude à la fécondation pour tous les croisements envisagés ici peut donc être considérée comme homogène. Les écarts de fertilité observés dans tous ces croisements sont indépendants des gènes étudiés. Il est vraisemblable que toutes ces différences de fertilité entre souches F_1 ont le même déterminisme que les écarts de fertilité entre croisements s × s et A × A.

On est donc en droit de conclure que les interactions *CE* et *CD* n'ont aucun effet sur la fertilité dans le sens ♀*C* × ♂*E* (ou ♀*Cde* × ♂*cdE*) et ♀*C* × ♂*D* (ou ♀*Cde* × ♂*cDe*). Cette conclusion est aussi valable pour les croisements réciproques impliquant un seul gène de barrage et son allèle supposé amorphe, puisque les résultats des croisements *C* × *c*, *D* × *d* et *E* × *e* ont été inclus dans cette étude.

3° Conclusions.

L'interaction B_1B_2 n'a aucun effet sur la fertilité des croisements. Les anomalies majeures de la fertilité entre les souches F_1 ont le même déterminisme que les deux autres barrages.

L'interaction entre les gènes *C* et *E* détermine une semi-incompatibilité : stérilité totale dans le sens ♀*E* × ♂*C* et fertilité normale en sens inverse. L'interaction entre les gènes *C* et *D* n'a aucun effet sur la fertilité dans le sens ♀*C* × ♂*D*, mais elle détermine des degrés variés de fertilité (de 0 à 100 %) pour le croisement ♀*D* × ♂*C*. Ces deux interactions sont remarquables par la dissymétrie de leurs effets : dans les deux cas, les anomalies de fertilité ne portent que sur l'un des deux croisements réciproques. La semi-incompatibilité entre les souches s et A (stérilité du croisement ♀*A* × ♂*s*) résulte uniquement de l'interaction entre les gènes *C* et *E*; cette stérilité du croisement ♀*E* × ♂*C*, masque la fertilité variable avec la température du croisement ♀*D* × ♂*C*. Entre les souches s et A on peut schématiser les résultats de la manière suivante :



Le symbole ⟷ représente une fertilité normale pour les deux croisements réciproques ($B_1 \times B_2$), ⇢ une fertilité partielle et variable avec la température dans le sens ♂ × ♀ (♂*C* × ♀*D*) et ⊣ un cas de stérilité (♂*C* × ♀*E*).

D. — DÉTERMINISME DU CARACTÈRE ABERRANT DES ASCOSPORES

Nous avons vu que les asques tétrasporés issus du croisement ♀*s* × ♂*A* réalisé dans les conditions habituelles (25-26°) étaient de deux types : les uns contiennent quatre spores de taille normale, les autres deux spores de taille normale et une ou deux spores de taille réduite, l'anomalie se localisant toujours dans un même demi-asque. Ces « petites spores » sont binucléées comme les spores normales : elles germent parfaitement et peuvent être remplacées parfois par deux spores uninucléées de taille encore plus réduite. Dans les tétrades, la maturité des spores de taille réduite est plus tardive; ce n'est qu'immédiatement avant la projection de l'asque que ces spores se pigmentent. Ces spores présentent donc deux anomalies : leur taille réduite et leur pigmentation tardive.

Ce caractère varie avec la température. A 32°, aucune spore de petite taille n'est observée. A une température inférieure à 20°, au contraire, la quasi-totalité des asques contiennent deux spores de taille normale et deux spores de taille réduite; les autres contiennent des ascospores qui sont toutes de taille réduite. Cette anomalie a donc un déterminisme précis dont l'efficacité, nulle à 32°, variable à 25° et apparemment totale à une température inférieure à 20°, rappelle l'action de la température sur la fertilité des croisements ♀*D* × ♂*C*. On pouvait se demander si ces deux anomalies, spores de taille réduite d'une part et fertilité variable d'autre part, ne dépendaient pas de la même interaction.

Nous avons donc observé les asques issus des croisements entre souches F_1, à trois températures différentes. Cette anomalie apparaît régulièrement dans les croisements *Cd* × *cD* et uniquement dans ceux-ci, quel que soit le reste du génotype des souches. L'absence de toute anomalie dans les fructifications *cd* × *cD* et *Cd* × *cd* montre que c'est l'interaction *CD* qui est responsable de ce phénomène. Dans les périthèces hybrides *Cd* × *cD* les spores anormales se retrouvent avec la même fréquence et la même distribution que dans les fructifications ♀*s* × ♂*A*. Si les cultures sont réalisées à moins de 20°, 99 % des asques environ contiennent deux spores normales et deux spores de taille réduite; les asques restants contiennent quatre spores de taille réduite.

Pour une étude précise du déterminisme de cette anomalie nous avons prélevé, dans les fructifications hybrides *Cd* × *cD*, environ 400 asques et classé les spores en deux catégories : taille réduite ou taille normale. Le génotype de toutes ces spores a été déduit de l'étude des souches qu'elles fournissent. A l'exception des asques post-réduits

pour *Cc* et pré-réduits pour *Dd* (fréquence de 0,15 %) qui n'ont pas été décelés, tous les autres types possibles de tétrades ont été retrouvés et sont schématisés dans la figure 4 où nous représentons une seule spore par demi-tétrade.

On voit : 1° que toutes les spores contenant les gènes *C* et *D* sont de petite taille, que ces gènes soient ou non localisés dans un même noyau; 2° que les spores ne contenant ni *C*, ni *D* sont toujours normales; 3° que les spores contenant *C* et non *D* sont également nor-

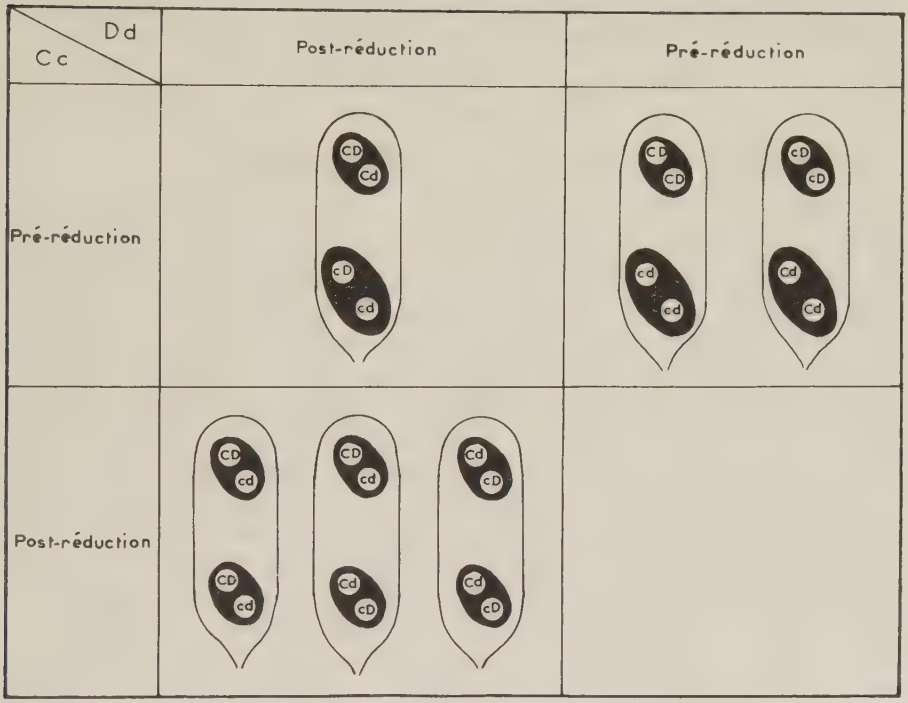


Fig. 4. — Génotypes des spores binucléées de taille normale et de taille réduite dans les asques hybrides *Cd* × *cD*.

males; 4° que les spores qui contiennent *D* et non *C* sont normales ou anormales selon qu'elles contiennent ou non l'allèle *d*.

L'anomalie n'affecte donc jamais les spores qui ne contiennent pas le gène *D*, alors qu'elle affecte les spores qui ne contiennent pas le gène *C*. On peut rendre compte de cette dissymétrie en admettant que la présence du gène C entraîne une prédétermination dans l'asque hybride *Cc* qui se traduit par le caractère anormal des spores *cD* + *cD*. On peut d'ailleurs montrer que cette prédétermination se manifeste tout aussi bien dans les asques de même composition, issus du croisement réciproque ♀*cD* × ♂*Cd*, stérile à 18°, mais réalisable à 25°.

Cette hypothèse à elle seule ne suffit cependant pas à rendre compte de la totalité des résultats : il reste à expliquer pourquoi les spores hétérocaryotiques *cD* + *cd* manifestent toujours le phénotype normal, alors que ces souches ne diffèrent des précédentes que par la présence ou l'absence du gène *d*. Peut-être s'agit-il de l'interaction entre les deux allèles *D* et *d* signalée plus haut (voir p. 640) à propos des thalles qui ont précisément le même génotype que ces spores.

En résumé, dans le croisement ♀*s* × ♂*A*, comme dans le croisement ♀*D* × ♂*C*, c'est l'interaction entre les gènes *C* et *D* qui est responsable de l'anomalie des ascospores.

CHAPITRE II

L'INCOMPATIBILITÉ ENTRE SOUCHES A, B, E, F, S ET s

A. — PROBLÈMES POSÉS ET MÉTHODES D'ÉTUDE

Ces six souches permettent la réalisation de 15 confrontations et de 15 croisements différents. Chacune des confrontations se traduit par un barrage et on note des anomalies de fertilité variées : dans trois cas, pour un seul des deux croisements réciproques et, dans neuf cas, pour les deux à la fois (cf. tableau X, p. 662). L'étude du croisement s × A, comme les études réalisées antérieurement sur des croisements analogues (Rizet, 1953, et Rizet et Esser, 1954), a montré que plusieurs systèmes élémentaires de barrage étaient superposés. Il en est sans doute de même pour les 14 croisements qui restent à analyser.

Dans cette étude, deux points surtout nous intéressent : 1° savoir si toutes les manifestations d'incompatibilité résultent de l'interaction de deux gènes seulement (allèles ou non allèles); cette étude est possible en analysant individuellement les 14 autres croisements; 2° estimer, à partir de ces croisements, le nombre des systèmes responsables d'incompatibilité chez cette espèce; cette étude suppose la comparaison des systèmes d'incompatibilité mis en évidence dans deux croisements différents. La solution de ce dernier problème est forcément très laborieuse puisque cette étude revient à comparer des génotypes de souches F_1 aussi différents que ceux des souches sauvages.

Nous avons préféré la méthode suivante. Nous commençons par étudier les descendants de deux croisements dans lesquels l'un des parents est commun (s × E et s × F); la technique d'analyse est la même que celle décrite en détail pour le croisement s × A. Nous déterminons ainsi deux groupes de systèmes de barrage : systèmes sE d'une part et sF de l'autre. Les systèmes du premier groupe sont ensuite comparés à ceux du second. Cette étude permet de déduire des génotypes au moins partiels pour les souches s, E et F. L'étude d'un nouveau croisement entre la souche s et une nouvelle souche (B par exemple) nous permet à la fois de compléter les trois génotypes précédents et de préciser celui de la nouvelle souche. On répète ensuite la même expérience avec les souches S et A.

B. — LES MÉCANISMES D'INCOMPATIBILITÉ ENTRE SOUCHES s, E et F

1° L'incompatibilité entre la souche s et la souche F.

Si l'on réalise un croisement s × F par confrontation, les périthèces ne se forment que sur la souche s : apparemment il s'agit d'une semi-incompatibilité. Si l'on réalise ce même croisement par spermatisation, ce phénomène se retrouve avec deux modalités intéressantes. Le croisement ♀*F* × ♂*s* n'est pas totalement stérile : sa fertilité comparée à une fertilité normale est comprise entre 10^{-3} et 10^{-4}. Le croisement réciproque n'a pas une fertilité normale : son degré de fertilité est de l'ordre de 10^{-1}. Lorsqu'on réalise le croisement ♀s × ♂F à une température inférieure à 20°, une autre anomalie apparaît : l'existence, dans quelques asques, de demi-tétrades constituées par deux spores hyalines, de taille réduite et incapables de germer; cette anomalie ne se retrouve pas dans le croisement réciproque (Pl. I, *F*).

Les souches F_1 homocaryotiques issues du croisement ♀s × ♂F ont été analysées : 25 % ont une croissance anormale; l'étude des souches à croissance normale met en évidence quatre couples de gènes et quatre systèmes élémentaires de barrage, dont l'un résulte de l'interaction entre les gènes allèles *S* et *s* déjà connue (Rizet, 1952). Nous appellerons P_1P_2, R_1R_2 et q_1q_2 les trois autres couples. Les interactions génétiques responsables du barrage peuvent être schématisées de la manière suivante :

Le cas des gènes *S* et *s*, q_1 et q_2 n'appelle aucun commentaire particulier. Par contre, les deux systèmes où intervient le gène R_1, en tout point analogues à des mécanismes déjà décrits (Rizet et Esser, 1954), méritent d'être envisagés avec plus de détails. L'interaction R_1R_2 peut être mise en évidence grâce au barrage qui se forme entre souches ne différant que pour ces gènes : il y a barrage entre souches P_1R_1 et P_1R_2 et croissance anormale et instabilité des thalles hétérocaryotiques $P_1R_1 + P_1R_2$. L'interaction P_2R_1, elle, ne peut être mise en évidence directement par l'observation d'un barrage entre souches ne différant que par ces gènes, mais elle est décelée par la présence de souches homocaryotiques R_1P_2 à croissance anormale. Pour les loci P et R, trois formules génotypiques seulement correspondent à des souches normales : P_1R_2, P_1R_1 et P_2R_2.

Les interactions Ss et q_1q_2 n'ont aucun effet sur la fertilité. Entre deux souches F_1 ne différant que pour les allèles R_1 et R_2, la fertilité des croisements réalisés par spermatisation est normale dans le sens $♀R_2 \times ♂R_1$ et égale à 10 % en sens inverse; cette fertilité est identique à celle des croisements $♀P_1R_1 \times ♂P_2R_2$ et $♀s \times ♂F$. Dans le sens $♀P_2R_2 \times ♂P_1R_1$ la fertilité est comprise entre 10^{-3} et 10^{-4}, comme celle du croisement ♀F × ♂s. On peut donc admettre que seuls les gènes R_1, R_2 et P_2 sont responsables des anomalies de fertilité entre souches s et F.

Les spores avortées trouvées dans le croisement parental ♀s × ♂F se retrouvent uniquement dans les croisements entre le parent s et les souches F_1 portant le gène S, et seulement si la souche s est utilisée comme femelle. C'est un aspect nouveau de l'interaction entre les gènes S et s déjà bien connue (Rizet, 1952; Beisson-Schecroun, 1962). Nous y reviendrons ultérieurement; signalons que, comme dans le croisement s × S, les souches F_1 de génotype s ont le phénotype s^s (Rizet, 1953).

2° *L'incompatibilité entre la souche s et la souche E.*

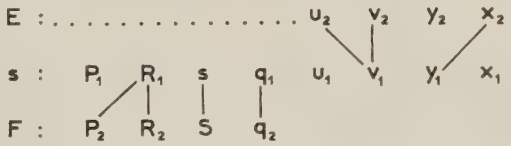
La fertilité du croisement $♀s \times ♂E$ est identique à celle du croisement $♀s \times ♂F$: elle paraît normale lorsque les croisements sont réalisés par confrontation; elle est de 10^{-1} environ lorsque les croisements sont réalisés par spermatisation. Le croisement réciproque $♀E \times ♂s$ est toujours totalement stérile.

Plus de 40 % des souches homocaryotiques F_1 ont une croissance anormale. L'analyse génétique des autres souches permet de mettre en évidence trois systèmes élémentaires de barrage faisant intervenir quatre couples de gènes que, provisoirement, nous appellerons u_1u_2, v_1v_2, y_1y_2, x_1x_2. Le schéma ci-dessous représente les génotypes des souches s et E et les interactions génétiques responsables des barrages :

Le gène y_1, tout comme le gène R_1, étudié plus haut, intervient dans deux systèmes d'incompatibilité différents dont la mise en évidence a posé les mêmes problèmes que précédemment. L'interaction entre v_1 et u_2 est déduite essentiellement du caractère anormal des souches u_2v_1.

3° Relations entre les génotypes des souches s, E et F.

Si l'on réunit les deux génotypes affectés successivement à la souche s, on peut schématiser l'ensemble des systèmes d'incompatibilité mis en évidence par l'étude des deux croisements précédents.



Ces systèmes d'incompatibilité font intervenir au maximum huit loci. Toutefois, il apparaît une analogie entre les systèmes dans lesquels intervient le gène R_1 et ceux où intervient le gène v_1. Il n'est donc pas impossible que R_1 et v_1 correspondent à un même gène et que l'identité s'étende à d'autres gènes impliqués dans ces mécanismes. Par contre, rien n'indique une identité entre les couples *Ss* et q_1q_2 d'une part, et les couples y_1y_2 et x_1x_2 d'autre part; en effet, d'un côté il s'agit de barrages déterminés par l'interaction de deux gènes allèles et, de l'autre, d'un barrage provoqué par deux gènes non allèles.

Les rapports entre ces couples de gènes ont été précisés en utilisant la méthode suivante. Au cours de l'étude des croisements s × E et s × F, nous avons isolé tous les génotypes possibles de souches F_1 et, en particulier, les souches ne donnant pas barrage avec le parent s ou ne différant de ce dernier que par un seul gène ou par deux gènes. Il s'agit des souches suivantes :

Croisement s × E	*Croisement* s × F
a) u_1 v_1 y_1 x_1	1) P_1 R_1 s^s q_1
b) u_1 v_2 y_1 x_1	2) P_1 R_2 s^s q_1
c) u_2 v_2 y_1 x_1	3) P_2 R_2 s^s q_1
d) u_1 v_1 y_2 x_1	4) P_1 R_1 S q_1
e) u_1 v_1 y_2 x_2	5) P_1 R_1 s^s q_2

Nous avons réalisé toutes les confrontations possibles entre le premier et le deuxième groupe de souches en prenant soin d'utiliser de nombreux exemplaires de chaque type. L'ensemble des résultats obtenus est consigné dans le tableau VIII où l'on fait également figurer la souche s.

Plusieurs faits se dégagent à la lecture du tableau VIII.

a) Il ne se produit jamais de barrage entre souches de type 1 $(P_1R_1s^sq_1)$ et souches de type a $(u_1v_1y_1x_1)$; il n'y a donc aucun gène

appartenant à la souche collective E, et resté inapparent au cours de l'étude du croisement s × E, qui détermine un barrage avec un gène de la souche F demeuré également inapparent dans l'étude du croisement s × F : tous les barrages élémentaires entre les souches E et F sont donc déterminés par des gènes appartenant aux huit loci déjà cités.

b) Quatre autres séries de confrontations donnent également des contacts normaux et des fertilités normales. On observe ce type de

TABLEAU VIII. — RÉSULTATS DES CONFRONTATIONS ET DES CROISEMENTS ENTRE SOUCHES F_1 DU CROISEMENT s × F ET DU CROISEMENT s × E.

Même légende que pour le tableau VI, mais dans ces croisements les fertilités atténuées sont de plusieurs types.

			♂	croisement ♂ × E				
				a	b	c	d	e
			u1 v1 y1 x1	u1 v1 y1 x1	u1 v2 y1 x1	u2 v2 y1 x1	u1 v1 y 2 x1	u1 v1 y2 x 2
♂		P1 R1 s q1						
croisement ♂ × F	1	P1 R1 s^S q1						
	2	P1 R2 s^S q1						
	3	P2 R2 s^S q1						
	4	P1 R1 S q1						
	5	P1 R1 s^S q2						

relation chaque fois que les souches confrontées sont soit R_1P_1 et u_1v_1, soit P_1R_2 et u_1v_2, soit u_2v_2, soit P_2R_2 et u_1v_2 ou u_2v_2. C'est ce type de relation que l'on doit obtenir, si P_1 et u_1 d'une part, R_1 et v_1 d'autre part, ne sont qu'un seul et même gène. Les croisements 1 × c $(P_1R_1 \times u_2v_2)$ et a × 3 $(u_1v_1 \times P_2R_2)$ montrent des fertilités réduites et dans des proportions strictement identiques. P_2 et u_2 (allèles de P_1) et R_2 et v_2 (allèles de R_1), déterminent donc avec R_1 des manifestations d'incompatibilité en tout point comparables. L'impossibilité de distinguer P_2 de v_2 d'une part, et R_2 de u_2 de l'autre, laisse supposer que v_2 et u_2 sont identiques à P_2 et R_2. Dans la suite de l'exposé, nous retiendrons pour les deux couples d'allèles les symboles P_1P_2 et R_1R_2.

c) Les souches de type 4 forment barrage dans toutes les confrontations auxquelles elles participent, alors que les souches de type 1, qui n'en diffèrent que pour le gène qui occupe le locus S, n'en forment ni avec les souches de type a, ni avec une partie des souches de type d et de type e. Par ailleurs, à l'exception des souches de type 4, toutes les souches issues du croisement s × F ont le phénotype s^s : ces souches acquièrent toutes le phénotype [s] lorsqu'on les anastomose avec des souches s et E ou les souches F_1 issues de leur croisement. Ces résultats ne se comprennent que si la souche E porte le gène *s*.

d) Les souches de type 5 portant l'allèle q_2 donnent barrage avec toutes les autres souches : la souche E porte donc à ce locus un allèle identique à q_1. Ajoutons qu'en confrontant les souches F_1 du croisement s × F aux souches F_1 du croisement s × A (voir plus haut), il apparaît que le coupe q_1q_2 est superposable au couple B_1B_2.

e) D'autres faits apparaissent si l'on envisage les confrontations et les croisements entre souches de type 1 et de type d ou e. Les confrontations entre souches 1 et souches d donnent un contact normal ou un barrage selon les souches de type 1 que l'on utilise. Les souches de type 1 peuvent donc être divisées en deux groupes. Chacun de ces groupes apparaît encore hétérogène, si l'on envisage les confrontations et les croisements entre souches 1 et e : pour l'un des groupes on obtient soit des contacts normaux et une fertilité normale, soit des barrages et la stérilité de l'un des croisements réciproques; pour l'autre, on a toujours des barrages mais, selon les cas, les deux croisements réciproques sont fertiles ou l'un d'eux est totalement stérile.

Les souches de type a et de type d ne diffèrent que par un seul gène : les premières sont y_1 et les secondes y_2. Le gène y_2 est donc responsable des barrages entre souches de type d et certaines souches de type 1 (qui, elles, ne donnent jamais barrage avec les souches a). Dans les souches de type 1, le gène responsable de ce barrage a pour origine la souche F.

De nouvelles expériences sont nécessaires pour préciser ce mécanisme, qui intervient aussi dans le déterminisme de certains des barrages entre les souches de type 1 et de type e.

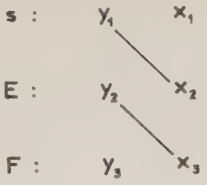
Nous avons fait l'analyse de croisements entre souches e et les quatre sortes de souches de type 1 prises successivement. Tous ces croisements donnent quatre types de descendants. Les souches de type 1 sont donc à la fois toutes différentes et différentes des souches de type e pour deux gènes seulement, allèles des gènes y_2 et x_2. Ceci montre que la souche F porte aux loci y et x deux gènes nouveaux que nous appellerons y_3 et x_3. Les souches de type 1 correspondent alors aux quatre génotypes suivants : y_1x_1, y_1x_3, y_3x_1 et y_3x_3. Entre souches de type 1 et souches de type d et e on peut, pour les loci y et x, présenter les résultats de la manière suivante :

		Type d	Type e
		$y_2 \times_1$	$y_2 \times_2$
Type 1	$y_1 \times_1$		
	$y_3 \times_1$		
	$y_1 \times_3$		
	$y_3 \times_3$		

Ces résultats sont identiques à ceux du tableau VIII. On voit que les barrages ont deux origines : l'interaction $y_1 x_2$ déjà mise en évidence au cours de l'étude du croisement s × E d'une part, et une interaction nouvelle entre le gène y_2 de la souche E et le gène x_3 de la souche F d'autre part. Cette dernière interaction, contrairement à la précédente, n'est pas responsable d'anomalies de fertilité.

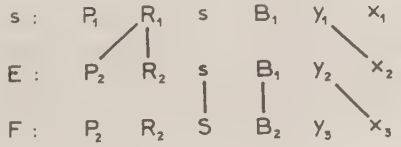
Cette étude permet d'expliquer l'hétérogénéité des résultats dans les confrontations entre souches de type e et les autres types de souches issues du croisement s × F. Sur la souche femelle e, les croisements sont stériles chaque fois que les descendants du croisement s × F portent le gène y_1. Dans les autres cas, le degré de la fertilité ne dépend que de la présence, chez les descendants s × F, des gènes R_2 et P_2.

On peut, pour les loci y et x, schématiser le génotype des souches s, E et F et les interactions responsables des barrages entre ces souches de la manière suivante :



4° Conclusion et vérification.

Il est possible d'écrire le génotype des souches s, E et F et de schématiser les interactions responsables de l'incompatibilité entre les souches s et E, s et F et E et F comme suit :



Ces génotypes rendent compte de toutes les observations faites, bien que les confrontations et les croisements entre les souches E et F n'aient pas été directement étudiés. On peut dès maintenant prévoir les résultats des croisements E × F : le barrage entre la souche E et la souche F doit résulter de la superposition de trois mécanismes élémentaires de barrage (*S* et *s*, B_1 et B_2, y_2 et x_3) ; aucun de ces mécanismes n'atténuant la fertilité, les croisements ♀*E* × ♂*F* et ♀*F* × ♂*E* devraient donc avoir une fertilité normale; toutes les souches F_1 portant le gène *s* doivent être de phénotype s^s; un quart des souches F_1 (y_2x_3) doivent avoir une croissance anormale; enfin le croisement ♀E × ♂F (♀*s* × ♂*S*) réalisé à 18° doit fournir une certaine proportion d'asques avec deux spores avortées dans la même demi-tétrade.

Nous avons réalisé l'étude du croisement E × F et toutes ces prévisions ont été confirmées.

C. — LES AUTRES SYSTÈMES D'INCOMPATIBILITÉ

L'incompatibilité entre les souches s et A a déjà été étudiée : nous savons que les souches s et A sont l'une B_1Cde et l'autre B_2cDE, et que trois types d'interaction (B_1B_2, *CD*, *CE*), sont responsables de barrages. Les souches B et S n'ont pas encore été envisagées.

Les souches F_1 issues du croisement s × A, dont le comportement est identique à celui des souches parentales s, portent en particulier les gènes *C*, *d* et *e*. Ce croisement fournit également trois types de souches qui ne diffèrent des précédentes que pour un ou deux gènes intéressant ces trois loci (souches *cde*, *cDe*, *cdE*). Les souches F_1 issues des croisements s × E et s × F et qui se comportent comme le parent s portent les gènes y_1 et x_1. On peut aussi isoler de ces croisements des souches qui ne diffèrent des précédentes que par les gènes occupant les loci y et x et portant, en particulier, y_2 et x_1, y_3 et x_1, y_1 et x_3, y_2 et x_2; le tableau IX schématise les résultats obtenus lorsqu'on confronte et l'on croise entre elles ces deux collections de souches.

1° L'homogénéité des résultats entre deux souches de génotype donné (barrage ou contact normal) montre qu'il n'y a pas cinq loci différents, mais seulement trois : les loci y et x doivent donc correspondre à deux des trois loci mis en évidence au cours du croisement s × A. Ce problème peut être résolu en identifiant les gènes de la souche s ayant reçu deux appellations différentes.

2° On voit que seules les souches F_1 issues des croisements s × E et s × F qui portent y_1 (souches y_1x_1 et y_1x_3) forment un barrage avec les souches *cDe* et *cdE*. D'après l'étude du croisement s × A, on sait que la souche s ne contient qu'un seul gène, *C*, responsable de barrage avec *D* et *E*. Il y a donc identité entre *C* et y_1. Le gène x_1 de la souche s doit donc correspondre à *d* ou à *e*.

3° On peut voir si x_1 est identique à *d* ou *e* en étudiant la descen-

dance des croisements $y_1x_3 \times cDe$ et $y_1x_3 \times cdE$. L'un seulement de ces croisements doit fournir des descendants de constitution génétique y_1x_1. L'expérience montre qu'il s'agit uniquement du premier : le gène x_1 est donc identique à *e*.

4° La présence d'un barrage entre souches *cde* et y_1x_3 est due uniquement à l'interaction cx_3. Chaque fois que l'un ou l'autre des gènes *c* et x_3 est absent, il n'y a pas barrage : c'est le cas entre souches *Cde* et y_1x_3 et entre les souches *cde* et les souches F_1 des croisements $s \times E$ et $s \times F$ ne portant pas x_3. Contrairement aux observations faites au

Tableau IX.

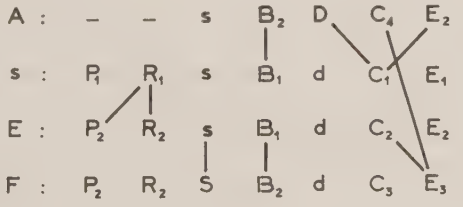
Résultats des confrontations et des croisements entre quelques souches F_1 des croisements $s \times A$, $s \times E$ et $s \times F$.

croisements $\delta \times F$ ♀ $\delta \times E$	croisement $\delta \times A$			
	Cde	cde	cDe	cdE
y1 x1				
y2 x1				
y3 x1				
y1 x3				
y2 x2				

cours du croisement $s \times A$, le gène *c* ne se comporte pas toujours comme un gène amorphe.

Les souches E et F ne contiennent pas de gène conduisant à un barrage dans lequel intervient le gène y_1, c'est-à-dire *C*, et un gène n'appartenant pas au locus x. On traduit ce fait en disant que les souches E et F sont *d*.

Il est maintenant possible, pour simplifier la nomenclature, de remplacer les symboles x et y par E et par C, en mentionnant que quatre allèles sont connus au locus C (C_1, C_2, C_3, C_4) et que trois allèles ont été définis pour le locus E. On aboutit alors, pour les souches s, A, E et F, aux génotypes mentionnés dans le schéma suivant, où figurent également les interactions génétiques responsables des barrages entre ces souches.



Dans ce schéma, E_1 se substitue à x_1 ou *e*, E_2 à x_2 ou *E*, E_3 à x_3; C_1 se substitue à *C* ou y_1, C_2 à y_2, C_3 à y_3 et C_4 à *c*. La nomenclature précédente relative aux loci C et E s'est révélée inadéquate puisque plus de deux gènes allèles sont mis en évidence pour chacun des loci

et que les allèles supposés amorphes (comme *c*) ne le sont pas dans tous les cas. La distinction entre C_2 et C_4 n'est pas évidente sur ce schéma; elle ne le devient en effet que si l'on envisage non plus les barrages seulement, mais aussi les anomalies de fertilité. Les croisements réciproques $C_2 \times E_3$ sont tous deux normalement fertiles. Le croisement $♀E_3 \times ♂C_4$ est stérile : il s'agit du croisement $♀x_3 \times ♂c$ dont le résultat est figuré dans le tableau IX.

Pour que la comparaison des souches s, E, F et A soit complète, il reste à préciser les allèles de la souche A existant aux loci P et R. A partir du croisement s × F, nous avons isolé des souches de génotypes $sB_2C_3dE_1$ et portant en même temps, soit P_1R_1 (type 1), soit P_1R_2 (type 2), soit P_2R_2 (type 3). Dans les confrontations réalisées entre la souche A et les souches de type 1, il n'y a jamais barrage. Par contre, des barrages se produisent constamment dans les deux autres cas. R_2 est donc responsable de ces barrages. L'analyse du déterminisme génétique de ces barrages montre qu'ils résultent d'une interaction entre gène allèles. Le barrage entre les souches de type 3 et la souche A résulte d'une différence portant sur deux couples de gènes et conduisant à deux mécanismes de barrage : l'un d'eux est identique à celui mis précédemment en évidence, le second fait intervenir P_2 et l'allèle de R_2 contenu dans la souche A. Ces résultats s'expliquent très bien si la souche A est P_1R_1, comme la souche s.

Il n'est évidemment pas impossible que de nouveaux systèmes d'incompatibilité apparaissent lorsque nous introduisons dans notre système les souches S et B non encore envisagées.

On sait que, dans de nombreux croisements S × s étudiés antérieurement (Rizet, 1952), le couple *Ss* paraît seul intervenir dans le déterminisme du barrage; il n'est évidemment pas impossible que d'autres gènes portés par ces souches jouent un rôle, lorsqu'on les confronte avec les souches A, B, E et F. Du croisement s × F, on peut isoler une souche $P_1R_1SB_1dC_1E_3$, qui ne diffère de la souche s que par la substitution des gène *S* et E_3 à leurs allèles *s* et E_1. Lorsqu'on confronte cette souche avec la souche S, on observe un barrage. Les souches F_1 issues de leur croisement diffèrent pour deux couples de gènes appartenant aux loci C et E : un quart de ces souches sont à croissance aberrante; les autres sont, soit C_1E_3, soit C_1E_1, soit C_4E_1. La souche S diffère donc de la souche s non seulement par la présence du gène *S*, mais aussi par celle du gène C_4. L'existence de ce gène C_4 n'est pas décelée dans les confrontations et les croisements entre les souches S et s, puisque l'action de C_4 n'est visible qu'en présence du gène E_3. En résumé, le génotype de la souche S est donc $P_1R_1SB_1dC_4E_1$.

Le barrage que l'on observe entre les souches S et B répond à un mécanisme très simple. Les souches F_1 issues du croisement S × B appartiennent à deux phénotypes seulement : les unes donnent seulement barrage avec le parent B, les autres seulement avec le parent S. L'incompatibilité entre les souches S et B est donc déterminée par un

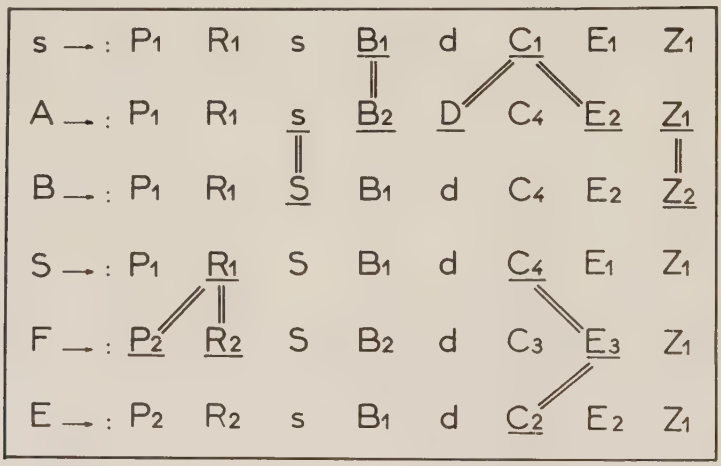
seul couple de gènes que nous appellerons Z_1Z_2. L'analyse des tétrades issues du croisement S × B révèle que le locus Z est voisin d'un centromère. Il nous a donc été facile de montrer que ce locus n'est identifiable à aucun autre des loci étudiés. Le croisement $♀Z_2 \times ♂Z_1$ est normalement fertile. Dans les conditions habituelles de culture, le degré de fertilité du croisement $♀Z_1 \times ♂Z_2$ est de 5×10^{-3} environ.

Les souches F_1 du croisement S × B ont également été confrontées avec des souches de génotypes extrêmement variés. Les résultats obtenus montrent que ces deux souches diffèrent également au locus E: alors que la souche S était E_1Z_1, la souche B est E_2Z_2. Le génotype de la souche B est donc $P_1R_1SB_1dC_1E_2Z_2$.

CHAPITRE III

CONCLUSION DE LA DEUXIÈME PARTIE

Au terme de cette étude, il est possible d'affecter à chacune des souches collectives un génotype dont l'écriture définitive rend évidemment caduques un certain nombre des symboles utilisés au cours des premières expériences. Ces génotypes sont groupés dans le tableau suivant.



Sur ce tableau sont indiqués (une seule fois pour en faciliter la lecture) les interactions conduisant à ce que nous avons appelé un barrage élémentaire. Pour désigner chacun de ces couples de gènes antagonistes, nous préférons le terme de système élémentaire d'incompatibilité.

Les gènes responsables de barrage se répartissent en huit loci. Pour certains loci, nous n'avons trouvé que deux allèles : c'est toujours le cas lorsque le barrage est déterminé par deux gènes allèles. Quatre allèles ont été trouvés au locus C et trois au locus E; dans ce cas, deux allèles différents peuvent intervenir dans le déterminisme de barrages différents. Aux loci D, C et E, l'un des allèles paraît amorphe *(d, C_3 et E_1)*. Mais ce caractère peut ne tenir qu'au nombre relativement limité de souches étudiées : nous savons déjà, à la suite d'études plus récentes, que le gène C_3 est aussi responsable d'un barrage. Ainsi, dans

le cas des interactions entre gènes non allèles (loci C et E en particulier), l'incompatibilité résulte d'interactions très spécifiques.

Quatre barrages résultent d'interactions entre gènes allèles : B_1B_2, Ss, R_1R_2, Z_1Z_2; cinq, d'interactions entre gènes non allèles : P_2R_1, C_1D, C_1E_2, C_2E_3, C_4E_3. Le même allèle peut intervenir dans deux systèmes différents : soit avec un allèle et un gène non allèle comme R_1 avec R_2 et P_2, soit avec deux gènes non allèles comme C_1 avec D et E_2 ou E_3 avec C_2 et C_4.

Le plus souvent, entre deux souches collectives données, plusieurs de ces systèmes se superposent (jusqu'à cinq pour les souches B et F); mais, dans les six souches étudiées, nous n'avons trouvé que les neuf systèmes élémentaires représentés plus haut.

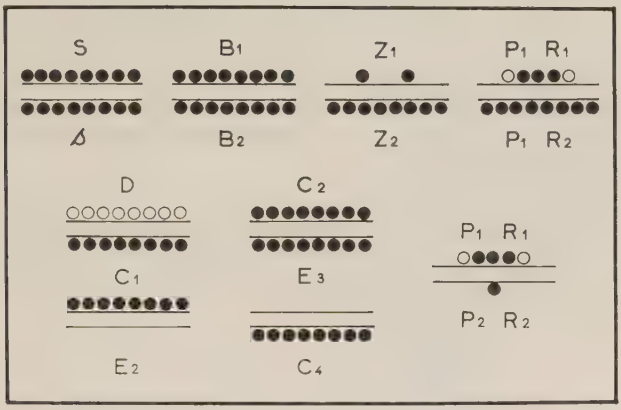


FIG. 5. — Degrés de fertilité des deux croisements réciproques pour chacun des neuf systèmes élémentaires d'incompatibilité. Les cercles représentent les fructifications. Huit cercles correspondent à une fertilité normale et 5, 3, 2 et 1 schématisent respectivement des degrés de fertilité de 80 %, 10 %, 0,4 % et 0,05 %. Les cercles noirs traduisent la fertilité minimum et la présence de cercles blancs symbolise des fructifications qui ne se développent qu'à certaines températures.

Outre le barrage qui correspond à une manifestation d'incompatibilité cellulaire, nous avons décrit au cours de cette étude un certain nombre d'anomalies qui toutes relèvent du même déterminisme génétique que les barrages élémentaires. Mais si tous les systèmes d'incompatibilité déterminent un barrage, certains d'entre eux seulement déterminent d'autres anomalies.

On voit sur la figure 5 que six seulement sur les neuf systèmes décrits provoquent des anomalies de fertilité. Chacun des croisements $S \times s$, $B_1 \times B_2$ et $C_2 \times E_3$ est normalement fertile dans les deux sens. Pour les croisements $C_1 \times E_2$ et $C_4 \times E_3$, l'un seulement des croisements réciproques est stérile (degré de fertilité inférieur à 10^{-5}) : dans les deux cas, la souche portant le gène E (E_2 ou E_3) ne peut être utilisée comme parent femelle. Dans les hybridations $Z_1 \times Z_2$, le croisement

$♀Z_1 \times ♂Z_2$ montre une fertilité atténuée. Les croisements $♀D \times ♂C_1$ et $♀R_1 \times ♂R_2$ $(♀P_1R_1 \times ♂P_1R_2)$ montrent une fertilité variable avec la température. Dans les croisements $♀D \times ♂C_1$, elle passe de 0 à 100 % entre 20° et 32°. Le cas du croisement $P_1R_1 \times P_2R_2$ est plus complexe, car deux interactions différentes interviennent. La première (R_1R_2) ne modifie la fertilité que dans le sens $♀P_1R_1 \times ♂P_2R_2$: la fertilité observée est en effet identique à celle relevée dans le croisement $♀P_1R_1 \times ♂P_1R_2$ déjà envisagé; la seconde (P_2R_1) ne concerne que le croisement réciproque $♀P_2R_2 \times ♂P_1R_1$: elle conduit à un degré de fertilité voisin de 4×10^{-4} et indépendant de la température.

Deux remarques peuvent être ajoutées à cette énumération. Dans tous les cas où un seul système de barrage intervient, l'un au moins des deux croisements réciproques a une fertilité normale. Par ailleurs, la diversité des manifestations décrites n'est pas le privilège des

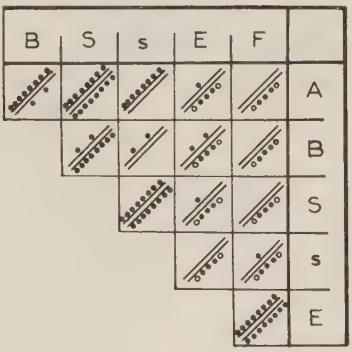


TABLEAU X.

DEGRÉS DE FERTILITÉ DES CROISEMENTS ENTRE LES SOUCHES COLLECTIVES A, B, S, s, E ET F.

interactions entre des gènes non allèles puisqu'on la retrouve également dans le cas des couples R_1R_2 *et* Z_1Z_2.

Il est maintenant possible de comprendre les résultats des 30 croisements possibles entre nos six souches (2×15, si l'on tient compte des deux croisements réciproques). Ces résultats sont représentés dans le tableau X où les symboles utilisés sont identiques à ceux de la figure 5.

En effet, nous connaissons le génotype de chacune des souches et les neuf systèmes élémentaires d'incompatibilité; nous avons également déterminé les mécanismes qui conduisent à la stérilité totale, partielle et dépendant ou non de la température, de certains croisements et évalué pour chacun d'eux le degré de fertilité. Il est clair que ces résultats, sans étude préalable des croisements entre les six souches collectives originelles, nous conduiraient également au tableau X. On peut vérifier en particulier que, lorsque les deux croisements réciproques montrent des anomalies de fertilité (9 croisements sur 15), c'est toujours le résultat de la superposition de deux mécanismes élémentaires d'incompatibilité.

En dehors des anomalies de fertilité, nous avons décrit plusieurs

souches à croissance anormale. Celles-ci apparaissent chaque fois que les deux gènes d'un système d'incompatibilité sont réunis dans un même noyau, ce qui n'est possible évidemment que pour les systèmes d'incompatibilité impliquant deux gènes non allèles. Ces souches réalisent une situation génétique « d'auto-incompatibilité » qui se traduit, en particulier, par des endo-barrages à un stade précis de leur croissance. Une situation d'auto-incompatibilité plus simple est réalisée chez les hétérocaryons qui portent les deux gènes antagonistes sur deux noyaux différents et se traduit aussi par des ségrégations végétatives des deux types nucléaires.

Enfin, d'autres anomalies ont été relevées, mais seulement dans des croisements particuliers : des spores de taille réduite dans les croisements $C_1 \times D$ et des spores avortées dans la descendance des croisements $♀s \times ♂S$ à basse température.

Pour un certain nombre de systèmes d'incompatibilité, l'interaction entre les gènes antagonistes peut se traduire par plusieurs types de manifestations, qui nous fourniront autant de possibilités d'analyse du mécanisme de ces interactions.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE GÈNES D'INCOMPATIBILITÉ

L'analyse formelle faite dans la deuxième partie, nous a montré que toutes les manifestations de l'incompatibilité ont un déterminisme génétique simple que nous avons appelé système élémentaire d'incompatibilité. Chacun de ces systèmes correspond à l'interaction de deux gènes (allèles ou non).

Quelles que soit les conditions expérimentales, toutes ces interactions conduisent au minimum à un barrage. Ce barrage, qui consiste en une réaction d'incompatibilité cellulaire, se manifeste au niveau des anastomoses entre deux thalles portant les gènes antagonistes, c'est-à-dire là où les deux protoplasmes se trouvent réunis.

Il est également d'autres situations où les deux gènes incompatibles se trouvent réunis dans un même cytoplasme : 1° à la suite d'un croisement, les deux gènes peuvent se trouver dans une même spore et portés soit par le même noyau, soit par deux noyaux différents; 2° au cours du croisement entre deux souches incompatibles, le gène porté par le noyau mâle et le gène antagoniste porté par le noyau femelle se trouvent réunis dans le cytoplasme de l'ascogone.

Dans le premier cas, cette réunion des gènes antagonistes aboutit à un processus d'auto-incompatibilité et à des anomalies variées dans le développement de certaines spores ou souches F_1. Dans le second, on observe des cas de stérilité totale ou partielle. Mais aucune des manifestations de l'interaction entre gènes incompatibles n'est aussi générale et symétrique que le barrage. Ces anomalies varient d'un cas à l'autre. La stérilité, en particulier, n'est observée que dans certains croisements; elle ne concerne toujours qu'un des deux croisements réciproques et, fréquemment, n'est que partielle.

Autrement dit, la même situation génétique — coexistence dans un même cytoplasme de deux gènes antagonistes — qui est toujours, au niveau des anastomoses entre deux thalles, létale pour les deux protagonistes, ne l'est pas forcément à d'autres phases du cycle de l'organisme et n'affecte pas également les deux protagonistes.

Il nous a donc paru qu'une analyse approfondie des diverses manifestations de l'interaction entre gènes d'incompatibilité serait de nature à nous renseigner sur les particularités du mode de fonctionnement de ces gènes.

Il n'était pas possible d'étudier toutes les manifestations de l'incompatibilité pour chacun des 9 mécanismes mis en évidence.

En fait, 5 mécanismes ont fait l'objet d'études approfondies : B_1B_2, où le barrage est la seule manifestation d'incompatibilité décelable; R_1R_2, où le barrage s'accompagne de la fertilité réduite de l'un des deux croisements réciproques; C_1E_2 et C_1D, où les manifestations différentes sont les plus nombreuses; enfin *Ss*, où l'existence de spores avortées, dans certaines conditions, se présente comme une manifestation nouvelle d'un mécanisme déjà bien connu (Beisson-Schecroun, 1962).

Pratiquement, cette étude du mode d'action des gènes d'incompatibilité sera conduite de la manière suivante. Dans le chapitre I nous étudierons le mécanisme des barrages. Dans le chapitre II nous analyserons le processus d'auto-incompatibilité et, dans le chapitre III, nous déterminerons les causes de l'incompatibilité sexuelle. Dans la conclusion générale, nous verrons que toutes les manifestations de l'incompatibilité résultent du même processus physiologique, mais varient selon les gènes en jeu, chacun d'eux présentant des propriétés particulières quant à son mode d'activité.

CHAPITRE PREMIER

LES DÉTERMINANTS CYTOPLASMIQUES DE L'INCOMPATIBILITÉ

A. — LA RÉACTION DE BARRAGE ET SES MODALITÉS

1° Description du phénomène.

L'observation microscopique d'hyphes prélevées dans la région d'un barrage révèle la présence d'articles morts; ces articles sont toujours en relation avec des anastomoses entre les hyphes des deux thalles participant à cette confrontation. Ces phénomènes peuvent être plus facilement suivis et étudiés lorsqu'on provoque, en gouttelette pendante, l'anastomose individuelle d'hyphes prélevées sur ces thalles.

Dans les cas d'hyphes appartenant à des thalles compatibles, le contact entre deux filaments est très vite suivi d'une anastomose. L'anastomose établit une continuité durable entre les deux partenaires et l'on peut voir les granules cytoplasmiques et les petites vacuoles migrer d'une hyphe dans l'autre, dans le sens du flux cytoplasmique. A la suite de l'anastomose, seuls les deux articles qui participent directement à la confrontation contiennent en mélange les noyaux des deux souches (Schroun, 1958); nous désignons pour cette raison l'ensemble de ces deux cellules sous le nom d'article mixte.

Les hyphes appartenant à des mycéliums incompatibles s'anastomosent tout aussi facilement. Cependant, peu de temps après l'anastomose, l'aspect des cloisons qui délimitent l'article mixte ne tarde pas à se modifier; l'épaississement des cloisons paraît provoquer l'obturation totale des pores, comme l'atteste l'absence d'échange des plus petits granules du cytoplasme entre l'article mixte et les articles immédiatement contigus des hyphes. Un dépôt simulant l'apparence d'une cloison plus ou moins continue se forme aussi à l'emplacement du point de contact. L'article mixte se vacuolise progressivement tandis que les granules cytoplasmiques grossissent et s'agitent de plus en plus violemment. Plus tard, le cytoplasme paraît totalement expulsé et la paroi se rétracte (Pl. II, *A*).

Dans le cas d'anastomoses entre des hyphes C_1 et D, C_1 et E_2, B_1 et

B_2, la mort de l'article mixte est effective 3 heures après le début de l'anastomose. Dans le cas des souches S et s et dans les mêmes conditions de milieu, les réactions évoluent en une heure environ *(loc. cit.)*.

L'évolution de ces réactions dépend de l'état physiologique des thalles ou des hyphes qui sont confrontés. Elle est particulièrement rapide lorsqu'on anastomose, quelques heures après la germination des spores, de très jeunes thalles : à peine plus d'une heure dans le cas des thalles C_1 et E_2, C_1 et D, B_1 et B_2, moins de 30 minutes dans le cas des thalles S et s. Le cytoplasme, dans lequel s'individualisent rapidement de petites vacuoles de forme sphérique, paraît très vite coaguler sur place en une structure granuleuse. Cette différence dans le déroulement et l'aspect des réactions paraît devoir être simplement expliquée par la très grande richesse en protoplasme des hyphes des très jeunes thalles. Par contre, lorsque les hyphes confrontées appartiennent à des thalles maintenus en milieu appauvri, les réactions passent toujours par une longue phase d'éclipse apparente du contenu cellulaire, et évoluent avec beaucoup plus de lenteur.

Assez souvent, notamment dans le cas des thalles C_1 et D, la réaction d'incompatibilité est dissymétrique et n'intéresse que la souche D. Cependant, la réaction a visiblement débuté sur l'article de la souche C_1, immédiatement au contact du thalle D, mais elle s'est assez vite arrêtée. Chaque fois que la réaction est ainsi dissymétrique, nous avons vérifié que la cloison formée au point d'anastomose est totalement obturée; dans les autres cas, elle reste ouverte au moins partiellement.

En résumé, le mélange des protoplasmes appartenant à deux thalles incompatibles est létal : tous les mécanismes de barrage conduisent à ce même résultat. Dans le détail, les modalités de cette réaction d'incompatibilité dépendent non seulement des gènes responsables, mais aussi de divers facteurs : nous avons vu, en particulier, que l'âge des thalles et la richesse du milieu nutritif sont susceptibles de modifier sensiblement l'aspect et la vitesse d'évolution de toutes ces réactions. Nous allons étudier plus particulièrement l'influence de deux facteurs sur ces réactions : l'état physiologique des éléments confrontés et la température.

2° *Influence de l'état physiologique des cellules sur la réaction d'incompatibilité.*

Les réactions d'incompatibilité obtenues par confrontation directe des thalles l'ont été jusqu'alors à partir de mycéliums en pleine croissance. C'est le cas lorsque l'on confronte deux souches sur milieu gélosé ou que l'on anastomose individuellement deux hyphes en gout-

telette pendante. Mais la croissance des deux éléments à confronter n'est pas un préalable obligatoire à leur anastomose : on peut en effet obtenir des contacts protoplasmiques normaux lorsque l'un des deux partenaires se trouve à l'état apparent de repos.

a) Conditions étudiées.

La croissance de courts articles (10 à 15 μ environ) prélevés sur des hyphes très âgées ou sur des thalles maintenus en milieu appauvri ne reprend que quelques heures après leur isolement : assez souvent 12 heures, 18 heures même dans les cas les plus extrêmes. Lorsque de tels articles sont accolés à des hyphes, des anastomoses se produisent assez rapidement; l'hyphe émet latéralement une courte protubérance qui rejoint l'article, bien souvent avant que ce dernier ne régénère de manière visible. On peut donc étudier des confrontations faisant intervenir des fragments mycéliens de ce type. Nous avons donc ainsi confronté des articles B_1, B_2, E_2, D ou C_1 à des hyphes prélevées respectivement sur des mycéliums B_2, B_1, C_1 ou D et E_2.

b) Résultats.

On peut classer les modalités des réactions observées pour chaque type de confrontation (B_1B_2, C_1E_2 ou C_1D) en trois catégories. Dans la première, la réaction débute immédiatement après l'anastomose et se déroule de la même manière que si l'on confrontait deux hyphes. Dans la deuxième catégorie, la réaction débute assez rapidement, cependant les symptômes y sont comparativement plus atténués et la mort des cellules survient dans des délais plus importants (8 à 12 heures). Dans la dernière catégorie enfin, le contact est tout à fait normal; la réaction se produit plus tard lorsque l'article est visiblement en train de régénérer. Les résultats sont groupés dans le tableau XI (p. 670).

On voit que seuls les articles C_1 réagissent de la même manière qu'une hyphe entière. Les réactions sont quelquefois normales lorsque les articles sont E_2 ou B_2. Dans le cas des articles B_1 ou D, les réactions obtenues sont toujours retardées.

Dans un cas particulier nous avons voulu préciser l'influence de la taille de l'article sur le déroulement des réactions. Nous avons vu notamment que la réaction, dans le cas des articles D, ne se produit généralement qu'au cours de la régénération de l'article. Pour des articles D de plus grande taille (25 μ environ) la réaction se produit bien plus souvent que précédemment avant la reprise de la croissance des articles (8 articles sur 12, au lieu de 2 sur 18).

Tableau XI. — Résultats des confrontations entre hyphes et articles de génotypes incompatibles (explications dans le texte).

		Type de réaction				
		Immédiat		Retardé		
		Normal	Faible			
Articles.	D	0	2	16	C_1	Hyphes.
	E_2	3	13	5	C_1	
	B_2	2	11	4	B_1	
	B_1	0	6	7	B_2	
	C_1	14	0	0	E_2	
	C_1	11	0	0	D	

c) Discussion.

L'examen du tableau XI conduit à deux constatations intéressantes:

a) On voit que les réactions déterminées par les gènes C_1 et D, C_1 et E_2 ou B_1 et B_2 tendent à s'amorcer avec retard et à évoluer avec lenteur lorsque les confrontations mettent en jeu de courts articles D, E_2 ou B_1 et B_2. Les mêmes modifications s'observent aussi dans le cas d'articles S et s (Beisson-Schecroun, 1962). Cette modification de l'allure des réactions dépend en premier lieu de la taille de l'article : ce phénomène est particulièrement bien visible dans le cas des articles D, de tailles variées, que nous avons isolés. Il est donc vraisemblable que le déroulement des réactions dépend de la masse des protoplasmes qui participent à la confrontation. L'aspect des réactions dépend aussi de l'activité métabolique de l'article; on constate même que la réaction est bien plus visible dans le cas d'un court article D qui régénère, que dans le cas d'un long article à l'état de repos. Dans le cas d'un contact normal à l'origine, la durée du retard des réactions correspond assez bien au temps de latence qui précède la reprise de la croissance de l'article.

b) Au contraire, les réactions déterminées par les gènes C_1 et D ou C_1 et E_2 se manifestent d'une manière toujours normale lorsque l'article est C_1.

On peut donc penser que le caractère anormal des réactions envisagées plus haut ne dépend pas uniquement de l'état des cellules, mais aussi d'une déficience relative de l'expression phénotypique des gènes D, E_2, B_1 et B_2; cette déficience est simplement accentuée par la réduction de la masse du protoplasme et par l'absence d'activité cellulaire.

3° Action de la température sur la réaction d'incompatibilité.

a) Cas des interactions C_1E_2 *et* B_1B_2.

Lorsqu'on anastomose à des températures variant de 18 à 35° des hyphes E_2 et C_1 ou B_1 et B_2, les résultats des confrontations varient très peu : on note seulement que la réaction d'incompatibilité débute plus rapidement à 35° et tend à déborder légèrement l'article mixte, sans doute sous l'effet d'un certain retard dans la fermeture des cloisons ou d'une plus grande fluidité du cytoplasme.

b) Cas de l'interaction C_1D.

Par contre, entre une hyphe C_1 et une hyphe D, l'aspect des réactions dépend très largement de la température à laquelle sont cultivés ces deux mycéliums. Ce résultat ne peut surprendre : nous avons constaté à de multiples reprises que de nombreuses manifestations de l'interaction entre C_1 et D étaient sensibles à la température (cf. p. 642 et 646).

Pour des températures peu élevées (16 à 26°), la réaction se manifeste très vite après l'anastomose et l'article mixte meurt en 3 heures environ.

Pour des températures allant de 26 à 30°, la réaction se modifie à deux égards : le délai d'apparition des premiers symptômes de réaction devient plus long et varie assez largement (de 2 à 7 heures); la zone des réactions tend à se trouver topographiquement disjointe du point de contact, notamment sur les thalles D.

Pour des températures plus élevées (32 et 35°), les délais de réactions deviennent très importants (plus de 48 heures à 35°), et les articles meurent sur une zone pratiquement continue, s'étendant jusqu'à plus de 4 000 μ du point de contact, sur les hyphes des deux souches.

On voit donc que, plus la température est élevée, plus les retards des réactions tendent à devenir importants. Ces retards ont pour corollaire une extension sur les deux thalles de la zone de réaction.

On peut montrer que le caractère immédiat ou retardé des réactions dépend moins de la température de confrontation que de la température de développement des thalles C_1 et D. Si deux hyphes, C_1 et D, ayant effectué toute leur croissance à 35° sont placées à 18° et anasto-

mosées 2, 4 ou 10 heures après le changement de température, les réactions sont retardées dans le premier cas, plus ou moins tardives dans le second et immédiates dans le dernier. Il est donc possible de provoquer à 18° le même type de réaction qu'à 35°, à la condition que le temps de croissance à 18° soit relativement réduit. L'expérience inverse montre qu'on peut aussi provoquer à 35° le même type de réaction qu'à 18°.

4° *Conclusion.*

Le tableau XII résume l'ensemble des résultats précédents. On voit que la réaction d'incompatibilité peut se trouver retardée dans deux types de conditions :

— lorsqu'il y a une dissymétrie dans la taille et l'activité métabo-

Tableau XII. — Influence de l'état physiologique et de la température sur le type de la réaction d'incompatibilité

Génotypes confrontés	Nature des éléments confrontés	Type de réaction	
		Immédiat	Différé
B_1/B_2	1° Hyphe B_1/hyphe B_2	+	
	2° Article B_1/hyphe B_2		+
	3° Article B_2/hyphe B_1	+	+
C_1/D	1° Hyphe C_1/hyphe D	+ (20°)	+ (32°)
	2° Article D/hyphe C_1		+
	3° Article C_1/hyphe D	+	
C_1/E_2	1° Hyphe C_1/hyphe E_2	+	
	2° Article E_2/hyphe C_1	+	+
	3° Article C_1/hyphe E_2	+	

lique des éléments confrontés (cas des interactions B_1B_2, C_1D et C_1E_2) ; mais les éléments C_1 se distinguent de tous les autres en ceci qu'un court article a le même degré de réactivité qu'une hyphe;

— sous l'action de la température au cours de la croissance des hyphes, dans le seul cas de l'interaction C_1D. Nous ne savons pas encore si cet effet concerne seulement l'une des souches ou les deux. Toutefois, comme l'interaction C_1E_2 n'apparaît pas sensible à la température, il est vraisemblable que seule la souche D est affectée.

B. — ÉTUDE DE L'EXPRESSION PHÉNOTYPIQUE DES GÈNES D'INCOMPATIBILITÉ : LES DÉTERMINANTS CYTOPLASMIQUES DE L'INCOMPATIBILITÉ

1° Mise en évidence.

L'étude, chez *Neurospora crassa,* d'un cas d'incompatibilité analogue à ceux que nous venons d'envisager a montré que la réaction d'incompatibilité pouvait être provoquée par micro-injection, dans les hyphes d'une souche, du cytoplasme prélevé sur un autre thalle (Wilson, Garnjobst et Tatum, 1961). Cette réaction paraît donc correspondre à l'interaction de deux types de déterminants cytoplasmiques.

Chez *Podospora anserina,* le diamètre plus réduit des hyphes ne se prête pas à ce type d'expériences; on peut cependant arriver par une autre méthode à une conclusion identique.

a) Principe des expériences.

On peut mettre en évidence le rôle de déterminants cytoplasmiques dans la réaction d'incompatibilité grâce à un montage expérimental déjà utilisé chez cet organisme à propos de l'incompatibilité déterminée par les gènes *S* et *s* (Beisson-Schecroun, 1962). Les deux thalles incompatibles sont indirectement confrontés par l'intermédiaire d'une

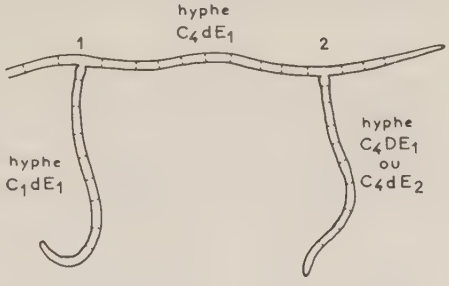


Fig. 6.

Schéma des expériences permettant la mise en évidence des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité.

1 et 2 représentent les points d'anastomose des deux hyphes incompatibles avec la souche intermédiaire et l'ordre chronologique de ces anastomoses.

troisième souche, compatible avec chacun d'eux, et à laquelle ils sont tous les deux anastomosés. Comme les anastomoses ne permettent pas, chez *Podospora,* la migration des noyaux d'une hyphe à l'autre, toute réaction se manifestant en un point quelconque des trois souches ne pourra donc résulter que du mélange des cytoplasmes.

Lorsque l'incompatibilité est déterminée par deux gènes non allèles, il existe toujours une souche avec laquelle les deux thalles porteurs des gènes de barrage donnent des confrontations normales; c'est le cas par exemple de la souche C_1dE_1 avec la souche C_1dE_1, d'une part, et les souches C_1DE_1 ou C_1dE_2 de l'autre (cf. fig. 6). Ce dispositif expéri-

mental ne peut être utilisé dans les cas où l'on ne dispose que de deux états protoplasmiques incompatibles; par exemple, lorsque l'incompatibilité est provoquée par les deux seuls allèles connus d'un même locus (B_1 et B_2, R_1 et R_2).

Les deux anastomoses sont pratiquées en deux points différents du tracé de l'hyphe intermédiaire qui peuvent être aussi distants qu'on le désire. On peut aussi obtenir les deux anastomoses, soit à peu près simultanément, soit plus ou moins nettement décalées dans le temps; enfin, avant que la deuxième anastomose soit réalisée, on peut interrompre le contact entre les deux souches précédemment confrontées en pratiquant une section sur la souche intermédiaire.

b) Résultats.

1° Le déterminant C_1. — Lorsque l'hyphe C_1 est anastomosée la première (cf. fig. 6), la réaction d'incompatibilité se produit toujours au point d'anastomose de l'hyphe intermédiaire et du filament E_2 :

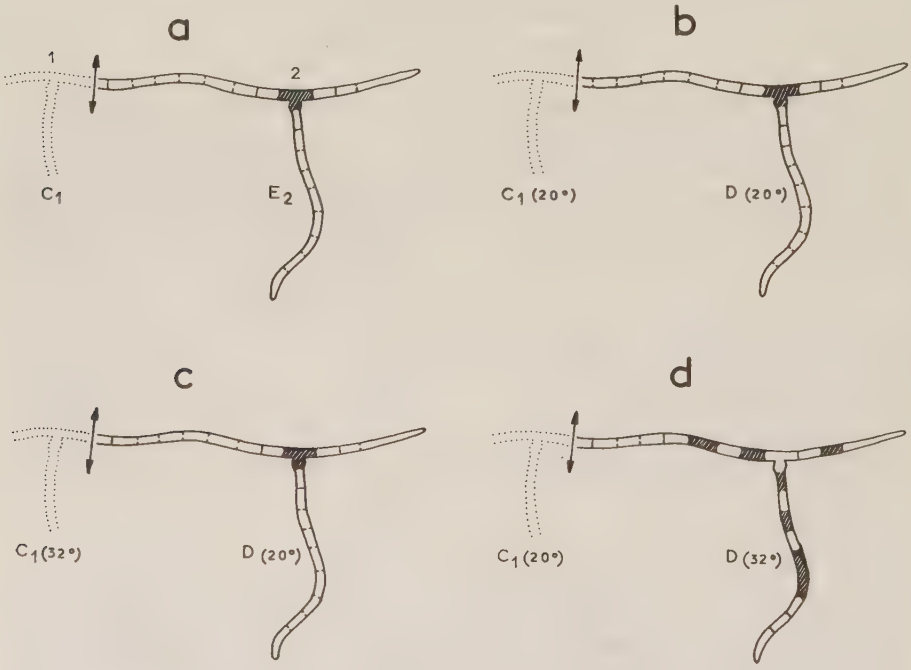


Fig. 7. — Mise en évidence du facteur cytoplasmique C_1 (explications dans le texte).

cette réaction est en tout point identique à celle que l'on obtient en confrontant directement une hyphe C_1 à une hyphe E_2. L'aspect des réactions reste inchangé même si les deux points d'anastomose sont éloignés de plus de 4 000 µ. On obtient également le même résultat

lorsqu'on élimine entièrement le filament C_1 avant la réalisation de la deuxième anastomose (fig. 7, *a*).

Lorsqu'on remplace l'hyphe E_2 par une hyphe D, le caractère des réactions dépend surtout de la température. A basse température (20° environ), la réaction est identique à celle que l'on observe avec une hyphe E_2 (fig. 7, *b*); cette réaction est la même que celle que l'on obtient en anastomosant directement dans les mêmes conditions de température une hyphe C_1 à une hyphe D. Lorsque les températures sont de 32° pour la croissance du thalle C_1 et de 20° pour la croissance du thalle D, l'aspect des réactions reste inchangé (fig. 7, *c*). Au contraire, dans la situation inverse (20° pour le thalle C_1 et 32° pour le thalle D), on ne discerne de signe de réaction que 24 heures après l'anastomose de la souche D : ces réactions conduisent dans des délais variables à la mort de cellules de la souche intermédiaire et de la souche D très largement dispersées autour du point de contact (fig. 7, *d*). Cette extension de la zone de réaction et le caractère différé des réactions sont les mêmes que pour les réactions observées au cours de la confrontation directe d'un thalle D et d'un thalle C_1, cultivés tous deux à 32°.

En conclusion, il existe, dans le protoplasme C_1, un facteur cytoplasmique responsable de la réaction d'incompatibilité avec les thalles D et E_2. Ce facteur est susceptible de migrer dans un cytoplasme d jusqu'à plus de 4 000 µ des noyaux C_1 et d'y conserver sa réaction propre. Comme l'aspect de la réaction ne dépend pas de la température au cours de la croissance du mycélium C_1, mais seulement de la température au cours de la croissance du thalle D, on peut conclure que les propriétés du facteur cytoplasmique C_1 sont indépendantes de la température.

2° ***Le déterminant*** **E_2.** — Lorsque des hyphes C_1 et E_2 sont anastomosées à peu près simultanément à l'hyphe intermédiaire C_1dE_1, la réaction se produit au point de contact de l'hyphe E_2 (fig. 7, *a*). Il en est de même si l'hyphe E_2 est anastomosée la première et lorsque la température au cours de la croissance des cultures est inférieure à 26°. Ce n'est qu'à partir de 28° que la zone de réaction se déplace vers des cellules appartenant exclusivement à la souche intermédiaire (fig. 8).

Ce dernier cas peut s'interpréter comme précédemment, en admettant qu'il existe, dans le protoplasme E_2, un facteur cytoplasmique responsable de l'incompatibilité avec C_1, qui peut migrer et réagir dans un protoplasme C_1dE_1. Mais, à la différence du facteur C_1, le facteur E_2 ne paraît capable de migrer qu'à une température supérieure à 26°.

3° ***Le déterminant*** **D.** — Nous savons déjà que le caractère des réactions entre le gène D et le gène C_1 dépend de la température au cours de la croissance du thalle D. Afin de préciser ce phénomène, il est nécessaire d'isoler l'intermédiaire cytoplasmique du gène D.

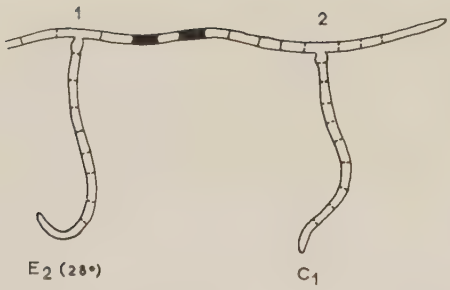


Fig. 8.

Mise en évidence du facteur cytoplasmique E_2 (explications dans le texte).

Ceci n'est possible, comme pour le déterminant E_2, que si le filament D est anastomosé le premier à la souche intermédiaire.

Lorsque les cultures sont placées à une température de 26°, le contact entre l'hyphe intermédiaire et le filament C_1 est normal. Ce n'est qu'une dizaine d'heures après la réalisation de cette anastomose

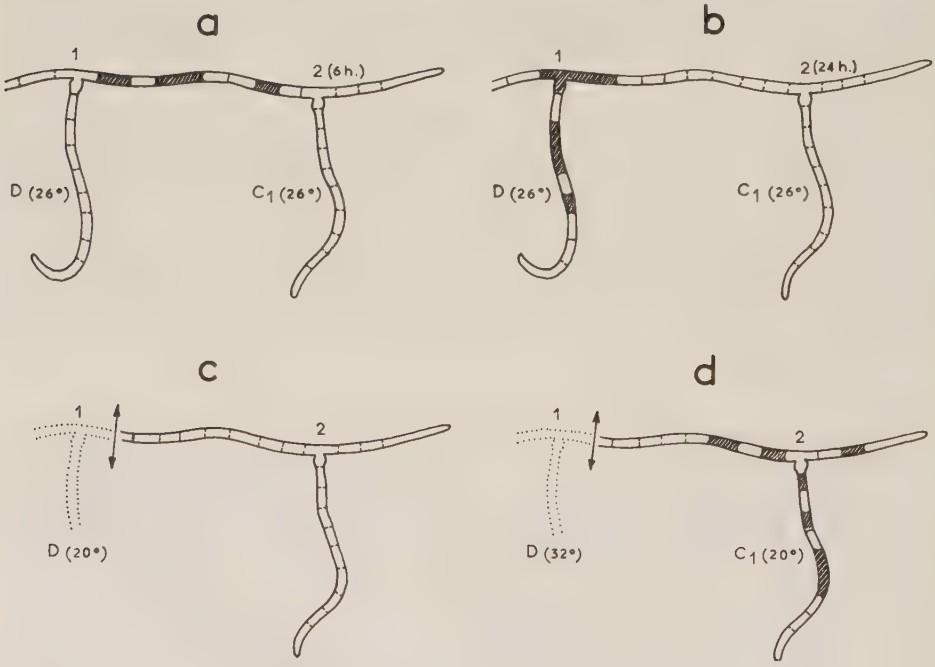


Fig. 9. — Mise en évidence du facteur cytoplasmique D et étude de ses propriétés (explications dans le texte).

que l'on arrive à distinguer des signes de réaction dans les cellules de la souche intermédiaire. Lorsque la distance entre les deux points de contact est voisine de 1 000 µ, on peut compter jusqu'à une vingtaine de cellules mortes, entre lesquelles se trouvent assez souvent des cellules d'apparence normale (fig. 9, *a*). Lorsque la deuxième anastomose est réalisée plus tardivement (24 heures après la première), la zone

de réaction s'étend aussi très progressivement à des cellules du thalle *D* (fig. 9, *b*); un contact cytoplasmique prolongé entre les deux premiers thalles et une croissance importante de la souche intermédiaire paraissent responsables de ce phénomène.

Lorsque le thalle *D* est cultivé à 20° et le contact de ce thalle avec l'hyphe intermédiaire interrompu avant la réalisation de la deuxième anastomose, il n'y a jamais de réaction (fig. 9, *c*). Au contraire, lorsque le thalle *D* est cultivé à 32° et le thalle C_1 à 20°, on obtient toujours des réactions : ces réactions (fig. 9, *d*) sont identiques à celles observées en confrontant directement un thalle C_1 et un thalle *D* cultivés tous deux à la température de 32°.

En conclusion, comme dans les cas précédents, il existe un facteur cytoplasmique D susceptible de migrer et de réagir dans une hyphe C_1dE_1. Ce facteur présente des propriétés variables selon la température. L'effet de la température, sur le caractère immédiat ou retardé de la réaction d'incompatibilité entre hyphes C_1 et *D*, affecte uniquement le facteur cytoplasmique D.

D'autre part, il semble que la température ne modifie pas la spécificité du facteur associé au gène *D*, puisque ces facteurs conduisent toujours à des réactions en présence du facteur C_1, mais seulement le délai de réaction. La température n'a aucun effet sur le déterminant D déjà présent dans le cytoplasme, comme le montre la stabilité des propriétés de ce déterminant dans les cellules où il n'est pas synthétisé. Il est donc vraisemblable que l'effet de la température s'exerce soit au cours de la synthèse du déterminant D, soit au niveau des précurseurs de ce facteur. Les changements de réactivité observés par suite de variations de la température (passage de 20° à 32° ou *vice versa*) correspondraient alors sans doute à la synthèse de déterminants D d'un type nouveau; comme ces changements ne sont pas immédiats, il semble que les facteurs formés à la température antérieure se diluent simplement au cours de la croissance.

c) Discussion.

Dans les expériences précédentes, tout se passe comme si l'hyphe intermédiaire C_1dE_1 constituait un simple conduit dans lequel peuvent migrer et réagir les facteurs cytoplasmiques associés aux gènes C_1, *D* et E_2. La rencontre des facteurs antagonistes C_1 et D ou C_1 et E_2 suffit à provoquer la réaction d'incompatibilité. Les gènes C_1, *d* et E_1 paraissent amorphes.

Cependant, si la mort de certaines cellules matérialise la rencontre de deux facteurs antagonistes, la totalité des résultats ne peut être expliquée par une alternative simple de présence ou d'absence des facteurs. Si l'on prend, en effet, comme réaction type celle que l'on observe au cours de la confrontation directe de deux hyphes incom-

patibles, il n'y a qu'un cas où elle se retrouve au cours de ces expériences : c'est celui où la première anastomose concerne l'hyphe C_1; la réaction d'incompatibilité est provoquée immédiatement par l'anastomose de l'hyphe intermédiaire avec les thalles D ou E_2 et n'affecte que l'article mixte. Dans la situation inverse, les phénomènes évoluent différemment. L'extension de la zone de réaction à un large secteur de l'hyphe C_1dE_1, lorsque le thalle D est anastomosé le premier, indique que les facteurs C_1 et D sont susceptibles de se croiser au cours de leur migration et montre clairement que leur rencontre ne provoque pas immédiatement une réaction. L'importance du retard des réactions et leur vitesse d'évolution dépendent de l'éloignement des deux points d'anastomose. L'hypothèse la plus simple consiste à admettre que la vitesse d'évolution des réactions est fonction de la concentration dans les cellules des deux facteurs antagonistes : les concentrations faibles conduiraient de préférence à des réactions s'amorçant avec retard et évoluant avec lenteur. On constate en effet l'existence d'un gradient décroissant de réactivité, à partir des points d'anastomose, qui pourrait refléter la décroissance de la concentration du facteur D le long de l'hyphe C_1dE_1.

Cette hypothèse sur le rôle de la concentration des facteurs cytoplasmiques antagonistes dans le déroulement de la réaction d'incompatibilité se trouve étayée par les résultats précédemment établis et groupés dans le tableau XI. Nous avons en effet observé des réactions différées dans le cas où l'on confrontait une hyphe d'une souche à un article de la souche antagoniste et nous avons vu que la vitesse de réaction dépendait de la taille de l'article et de son activité métabolique. On peut supposer qu'un petit article, ou qu'un article à activité métabolique réduite, renferme moins de facteurs cytoplasmiques qu'une hyphe en croissance. Dans ces conditions, nous obtenons une précision supplémentaire; ce qui est important pour obtenir une réaction typique c'est que les deux facteurs antagonistes aient non seulement une concentration suffisante, mais aussi une concentration équilibrée. Le comportement particulier des articles C_1, dans les anastomoses hyphe/article (cf. tableau XI), indiquerait alors que la concentration du facteur cytoplasmique C_1 se trouve plus élevée et plus homogène, dans les hyphes C_1, que celle des facteurs associés aux gènes D, E_2, B_1 et B_2, dans les hyphes correspondantes; l'expression phénotypique des différents gènes de barrage, si elle se traduit dans tous les cas par la présence d'un facteur cytoplasmique, peut donc présenter des modalités différentes selon les gènes. De plus, ces facteurs cytoplasmiques peuvent présenter des propriétés différentes. Nous avons vu en effet le rôle de la température sur l'allure de la réaction entre éléments C_1 et D, et nous avons admis que cette sensibilité à la température dépendait de la souche D; nous pouvons maintenant préciser que la température agit sur les propriétés des facteurs cytoplasmiques D en cours de synthèse, sans altérer celles des facteurs D déjà formés.

2° *Test de l'expression phénotypique des gènes d'incompatibilité.*

a) Principe des expériences.

Nous venons de voir que la réaction de barrage résulte de l'affrontement dans les cellules de déterminants cytoplasmiques associés aux gènes d'incompatibilité. Il est clair également que ces facteurs sont déjà présents dans les hyphes au moment de leur anastomose. On peut donc déceler la présence ou l'absence de ces facteurs en confrontant l'élément à tester avec une souche de référence contenant le facteur antagoniste.

Par cette technique, on peut déterminer le phénotype d'un fragment de thalle de n'importe quel âge et même de très jeunes hyphes, 2 ou 3 heures après la germination des spores. De plus, en mettant à profit diverses particularités du processus de formation des spores et de répartition des noyaux dans ces spores, la même technique permet également de préciser, comme nous allons le voir, si les gènes de barrage sont phénotypiquement exprimés dès la méiose, avant la germination des ascospores.

En effet, si certains gènes s'expriment très tôt après la méiose, on peut s'attendre à ce que leur produit d'activité se trouve réparti dans tout le cytoplasme de l'asque et donc englobé dans les spores indépendamment de leur génotype. Envisageons par exemple le cas d'un croisement $C_1 \times C_4$. Dans un asque pré-réduit, deux spores seront $C_4 + C_4$ et deux spores $C_1 + C_1$. Si l'on constate, en confrontant très tôt après la germination les jeunes thalles issus de ces quatre spores, avec une souche D par exemple, une réaction d'incompatibilité pour les quatre thalles, on sera en droit de conclure que le facteur cytoplasmique C_1 a commencé à être synthétisé avant la délimitation des ascospores. Il est également possible, de cette manière, de vérifier si le résultat obtenu peut varier avec le sens du croisement.

Nous envisagerons successivement les résultats obtenus pour les différents gènes S, s, E_2, D, C_1, B_1 et B_2.

b) Résultats.

1° Cas des gènes **S** *et* **s.** — Les spores issues des croisements $S \times S$ et $s \times s$ sont toutes de phénotype respectivement [S] et [s], dès la germination.

Seul le gène S se prête à une étude de son expression avant la germination. On sait en effet (Rizet, 1952) que, dans la descendance des croisements S × s, tous les descendants de génotype s ont un phénotype particulier : s^s, et sont compatibles à la fois avec S et avec s. Cette

transformation $s \longrightarrow s^s$ étant héréditaire, on peut appliquer la technique dont le principe vient d'être exposé aux spores issues des croisements $S \times s^s$.

Les jeunes thalles F_1 issus de ces croisements conduisent à trois types de résultats, lorsqu'on les confronte à des hyphes *s*.

1° Une réaction de barrage typique et rapide s'observe pour plus de la moitié des descendants.

2° Une proportion légèrement plus faible montre des réactions d'un aspect très particulier. Ces réactions, qui se manifestent un peu plus tardivement que les précédentes, en diffèrent surtout par deux points : elles évoluent toujours avec lenteur et présentent aussi la particularité de ne point affecter l'article mixte, mais un article voisin de ce dernier, toujours situé sur la souche F_1; la mort de cet article survient dans des délais très variables, pouvant aller de 8 à plus de 24 heures. Certaines réactions ne vont pas jusqu'à ce terme, mais régressent et disparaissent au bout de quelques heures.

3° Enfin, certaines anastomoses ne portent trace d'aucune réaction.

Nous avons réisolé et retesté, soit par une nouvelle confrontation, soit par croisement, toutes ces souches F_1. Celles qui donnent une réaction normale correspondent à des homocaryons *S* ou à des hétérocaryons $s^s + S$. Toutes les autres correspondent à des souches s^s : 80 % des souches s^s issues des croisements $S \times s^s$ donnent donc des réactions plus ou moins atténuées, mais toujours très visibles, avec la souche *s*.

La proportion des souches s^s qui réagissent au contact des mycéliums *s* ne dépend pas du sens des croisements $S \times s^s$, mais de deux facteurs seulement : du volume de la spore à l'origine de la souche, cette proportion tombe en effet à 20 % lorsque la souche s^s est issue d'une spore uninucléée; du temps qui sépare la réalisation des anastomoses de la germination des spores; pour un thalle âgé de 10 heures environ, on n'obtient que des réactions atténuées qui, très souvent, régressent rapidement; plus tard les confrontations restent toujours typiquement normales.

En résumé, la plupart des jeunes thalles de génotype s^s issus des croisements $S \times s^s$ ont, peu après la germination, un phénotype [S] qui indique la présence de facteur cytoplasmique S. On sait (Beisson-Schecroun, 1962) que ce facteur peut temporairement « infecter » un mycélium s^s et lui conférer le phénotype [S], mais que sa concentration décroît et s'annule au cours de la croissance ultérieure : l'aspect affaibli ou retardé des réactions observées traduit donc une concentration relativement faible de ce facteur et la similitude de ces réactions avec les réactions retardées décrites plus haut (cf. tableau XI) constitue un solide argument en faveur de notre interprétation en termes de variation de concentration des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité.

2° Cas du gène E_2. — Les souches issues du croisement $E_2 \times E_2$ et les mycéliums homocaryotiques E_2 et hétérocaryotiques $E_2 + E_1$ issus des croisements $E_1 \times E_2$ sont toujours de phénotype [E_2] dès la germination des spores : au contact d'un thalle C_1 les réactions se développent immédiatement.

Mais les mycéliums de génotype E_1 issus des croisements $E_1 \times E_2$ donnent toujours des contacts normaux avec les souches C_1. Ce résultat est indépendant du sens du croisement. Il reste vrai même lorsque les fructifications hybrides se développent à une température élevée (30° environ), qui favorise toujours la diffusion, dans le cytoplasme, des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité.

Le phénotype [E_2] n'est donc pas exprimé avant la délimitation des spores.

3° Cas du gène D. — Les thalles de génotype D issus des croisements $C_1D \times C_1D$ ou $C_1D \times C_1d$ sont tous de phénotype [D], tandis que les thalles de génotype C_1d issus du deuxième croisement ne présentent pas le phénotype [D]. Le phénotype [D] n'est donc pas exprimé avant la délimitation des spores.

Une particularité de l'expression du gène D peut être mise en évidence. En effet, contrairement au cas des hétérocaryons $E_1 + E_2$, les jeunes souches hétérocaryotiques $C_1D + C_1d$ donnent, avec les souches C_1, des réactions d'un type très particulier. Au début, les anastomoses restent très largement ouvertes; on n'observe que quelques heures plus tard des signes très discrets de réaction. Dans 50 % des cas environ, ces symptômes régressent et le contact redevient tout à fait normal. Dans les autres cas, on assiste à la mort très retardée d'un article, qui survient seulement 24 ou 48 heures plus tard; cet article n'est jamais l'article mixte, mais une cellule voisine de ce dernier, toujours située sur la souche $D + d$. Le phénotype [D] correspondant au génotype C_1D se trouve donc atténué en présence de noyaux C_1d.

Ce résultat surprend puisque l'on sait qu'il est possible, par une anastomose entre une hyphe C_1D et une hyphe C_1d, de conférer, au moins partiellement à cette dernière, le phénotype [D]; ceci montre que les facteurs D peuvent se maintenir dans les cellules C_1d. On peut donc penser que c'est la synthèse de ces facteurs qui est déficiente chez les souches hétérocaryotiques $C_1D + C_1d$. Pour essayer de comprendre cette contradiction, on peut essayer de rapprocher ce phénomène de deux types d'anomalies déjà signalés.

Nous avons montré en effet (voir p. 640) que la vitesse de multiplication des noyaux C_1D dans l'hétérocaryon $C_1D + C_1d$ est plus faible que celle des noyaux C_1d; on a vu également que cette contre-sélection débute peu après la germination des spores. Sans envisager le déterminisme de la sélection différentielle des noyaux D et d, qui implique une interaction d'un type particulier entre ces deux allèles, il paraît

logique de relier la déficience de l'expression phénotypique [D] au nombre réduit des noyaux *D* dans les cellules.

L'autre anomalie concerne les spores hétérocaryotiques $C_4D + C_4d$. Dans les périthèces hybrides $C_4D \times C_1d$, nous avons vu (cf. p. 647) que toutes les spores *D* étaient de taille réduite, sauf les spores $C_4D + C_4d$. Cette absence d'une des manifestations les plus caractéristiques de l'antagonisme entre les gènes C_1 et *D* — la formation de spores de taille réduite dans les fructifications hybrides — résulte également d'une interaction entre *D* et *d*.

Nous reviendrons plus tard sur le mécanisme de cette interaction. Retenons pour l'instant qu'elle entraîne une déficience de l'expression phénotypique du gène *D*, traduite par l'affaiblissement des réactions d'incompatibilité avec un thalle C_1. La présence du gène *d* constitue donc, avec la température, un deuxième facteur susceptible d'affecter l'expression phénotypique du gène *D*.

4° Cas du gène C_1. — Toutes les jeunes souches C_1 issues des croisements $C_1 \times C_1$ ou $C_1 \times C_4$ donnent immédiatement barrage avec les thalles E_2 ou *D* dès la germination des spores. 15 % des descendants de génotype C_4 issus des périthèces $C_1 \times C_4$ donnent également des réactions d'incompatibilité avec les deux mycéliums testeurs. Le sens du croisement $♀C_1 \times ♂C_4$ ou $♀C_4 \times ♂C_1$ n'a aucune influence sur ces résultats. Le gène C_1 est donc phénotypiquement exprimé avant la délimitation des spores.

Nous avons, d'autre part, confronté les jeunes souches C_1 à des mycéliums hétérocaryotiques $E_1 + E_2$ et $D + d$. Dans les deux cas, la réaction d'incompatibilité suit immédiatement l'anastomose.

Cependant la réaction entre $D + d$ et C_1 présente une particularité qui nous a permis de reconnaître une variation de réactivité des cellules C_1 en fonction de l'âge des thalles. En effet, lorsque les hyphes C_1 sont confrontées avec une hyphe $D + d$ très tôt après la germination, la réaction est immédiate et s'étend à de nombreuses cellules de l'hyphe $D + d$. Au contraire, si les hyphes sont prélevées sur des thalles C_1 plus âgés, elles donnent avec $D + d$ une réaction toujours très discrète (cf. p. 681). Il paraît donc se produire, au cours de la croissance d'un thalle C_1, une diminution de réactivité que nous pouvons interpréter comme un abaissement de la concentration du facteur C_1.

Cependant, la concentration la plus faible de ce déterminant est toujours supérieure à celle des facteurs D et E_2 : nous avons vu, en effet, que même de courts articles C_1 ont toujours la même réactivité que les hyphes, ce qui n'est pas le cas pour des articles *D* et E_2 (cf. tableau XI).

En testant des hyphes C_1 prélevées à des temps variés à partir de 2 ou 3 heures après la germination, nous avons constaté que ce changement s'opère régulièrement entre la douzième et la dix-huitième heure. De plus, nous avons constaté que l'expression « juvénile » du

gène C_1 peut être conservée, indéfiniment sans doute, à condition d'opérer des repiquages successifs d'articles C_1 de 10 heures en 10 heures environ. Le caractère juvénile se perd, si l'article C_1 est prélevé au-delà de 18 heures de croissance.

En résumé, le gène C_1 est phénotypiquement exprimé avant la délimitation des spores. La concentration des facteurs cytoplasmiques C_1, très élevée au début de la croissance des thalles issus de spores, décroît entre la douzième et la dix-huitième heure et se maintient à un taux plus bas.

5° Cas des gènes B_1 *et* B_2. — Les jeunes thalles B_1 et B_2 issus respectivement des croisements $B_1 \times B_1$ et $B_2 \times B_2$ sont phénotypiquement $[B_1]$ ou $[B_2]$ immédiatement après la germination des ascospores. L'allure de la réaction ne varie pas, dans ce cas, avec l'âge du thalle.

L'absence d'un allèle amorphe de ces deux gènes ne permet pas, comme dans les autres cas, de préciser à quel moment, avant la germination, débute leur expression phénotypique.

c) Conclusions.

La mise en évidence de facteurs cytoplasmiques, associés aux différents gènes de barrage, et dont l'interaction est responsable de la réaction d'incompatibilité, nous a conduit à préciser deux propriétés intéressantes de ces gènes.

1° Pour chacun d'eux, l'expression phénotypique apparaît à un moment précis au cours du cycle de croissance post-méiotique.

2° Pour les gènes S, s, E_2, B_1 et B_2, l'expression phénotypique est, une fois amorcée, stable et indépendante des conditions extérieures : au contraire, pour le gène C_1, elle varie à un stade précis de la croissance et, pour le gène D, elle varie en fonction de la température. Le tableau XIII (p. 684) résume les principaux faits.

C. — CONCLUSIONS

De l'ensemble des résultats qui viennent d'être exposés, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° A chaque gène d'incompatibilité est associé un facteur cytoplasmique responsable de la réaction de barrage. Chacun de ces facteurs est susceptible de migrer et de réagir avec le facteur antagoniste dans des cellules ne contenant pas les gènes de barrage correspondants.

2° Le résultat de la rencontre, dans une cellule, de deux déterminants antagonistes dépend de deux facteurs : *a)* De leur concentration relative. Lorsque ces facteurs se trouvent en quantité suffisante et équi-

Tableau XIII. — Expression phénotypique de quelques gènes d'incompatibilité a divers stades du cycle de développement

Gènes	Méiose / Asque : Délimitation des spores	Méiose / Asque : Maturation des spores	Mycélium : De moins de 3 heures	Mycélium : De 3 à 15 heures	Mycélium : Mycélium « adulte »
S	+	+	+	+	+
s	?	?	+	+	+
C_1	+	+	+++	+++	++
E_2	—	?	+	+	+
D	—	?	+	+	+
B_1	?	?	+	+	+
B_2	?	?	+	+	+

Légende : Le signe + indique que le phénotype est exprimé, le nombre des croix traduisant le niveau relatif de concentration des facteurs cytoplasmiques. Le signe — correspond à la non-expression du phénotype. La répartition des signes ? indique qu'au cours du développement de l'asque le phénotype n'a pu être précisé que dans une fraction des cas.

librée, le terme est toujours la mort de cellules. Lorsque l'un des déterminants est peu abondant, il se produit soit une réaction différée susceptible d'évoluer, mais avec beaucoup plus de lenteur, vers la mort de cellules, soit une réaction également différée, mais très affaiblie, dont les signes externes régressent, laissant la place à un contact normal. Si la concentration de l'un des deux déterminants est très faible, il peut même n'y avoir pas du tout de réaction. *b)* De propriétés particulières des facteurs cytoplasmiques. La rencontre de déterminants C_1 et E_2, B_1 et B_2 ou s et S provoque une réaction d'incompatibilité immédiate, quelle que soit la température. Au contraire, les propriétés de réactivité des facteurs D varient avec la température à laquelle ils ont été synthétisés : réaction immédiate et localisée à 20°, réaction différée et étendue à 32°.

Il est intéressant de constater, d'un point de vue général, que tous ces facteurs cytoplasmiques ne constituent pas un composant transitoire ou aléatoire du protoplasme : chaque hyphe individuelle contient toujours suffisamment de facteur cytoplasmique pour donner une réaction typique. Ce n'est qu'au niveau de très petits éléments (courts articles) que l'on peut déceler éventuellement des discontinuités ou des variations de concentration de ces facteurs.

3° Chaque gène de barrage se caractérise non seulement par la spé-

cificité de son produit cytoplasmique, mais aussi par le rythme et les modalités de son expression phénotypique : c'est-à-dire le moment où cette expression apparaît après la méiose, le niveau de concentration des facteurs cytoplasmiques et, pour le seul gène *D*, sa sensibilité à la température et à la présence du gène *d*.

De plus, si l'on compare les propriétés des gènes antagonistes, il apparaît, au moins dans deux cas, une nette dissymétrie dans leur expression : C_1 et E_2 diffèrent par le moment d'apparition de leur expression et la concentration relative, dans les cellules, de leurs intermédiaires cytoplasmiques; C_1 et *D* diffèrent, de plus, par le fait que l'expression phénotypique [D] est sensible à la température. Ces nouvelles dissymétries ne sont sans doute pas sans rapport avec celles mises en évidence à propos des manifestations de l'incompatibilité autres que le barrage.

CHAPITRE II

L'AUTO-INCOMPATIBILITÉ

Lorsqu'une fécondation est réussie, les deux gènes responsables d'un système élémentaire d'incompatibilité coexistent dans un même cytoplasme, celui de l'ascogone, au sein duquel les noyaux mâles et femelles subissent un certain nombre de mitoses avant la formation des jeunes asques.

Quelle que soit l'interaction envisagée, aucune anomalie n'a été décelée à ce stade, et les périthèces « hybrides » pour deux gènes antagonistes contiennent le même nombre d'asques que les fructifications obtenues sur les thalles parentaux.

Les premières anomalies se manifestent au plus tôt, et dans quelques cas seulement, au cours de la formation des spores. Le plus souvent, les spores incluant les deux gènes antagonistes sont normales, ainsi que leur germination et le début de leur croissance. L'incompatibilité ne se révèle que lorsque les thalles sont en pleine évolution. Ceci est vrai dans tous les cas, que les gènes antagonistes soient allèles ou non et associés ou non dans un même noyau.

Cette auto-incompatibilité cellulaire rentrerait évidemment dans le cadre du chapitre précédent. Son étude dans un chapitre particulier se justifie par l'originalité et la très grande variété des manifestations observées, dont l'aspect le plus remarquable est le caractère différé de l'auto-incompatibilité. Notre analyse portera donc surtout sur les modalités et le déterminisme de ces effets retardés.

A. — ÉVOLUTION DES THALLES AUTO-INCOMPATIBLES

La germination des spores homocaryotiques C_1D et C_1E_2 et des spores hétérocaryotiques $B_1 + B_2$ a été réalisée sur milieu gélosé et en gouttelette pendante. Cette dernière technique permet surtout une observation très précise de la croissance des thalles et de les tester très rapidement après leur germination; mais les deux techniques doivent être envisagées car, pour un même génotype, l'évolution des souches n'est pas la même sur ces deux milieux.

1° *Description de la croissance.*

a) Les jeunes thalles.

En gouttelette pendante, les spores C_1D, C_1E_2 et $B_1 + B_2$ germent avec la même fréquence que les spores sauvages et les premiers stades de la croissance se révèlent parfaitement normaux. Cette croissance banale est toujours brève : de 6 à 18 heures selon les cas. Après cette période, les hyphes cessent de s'allonger presque totalement et subissent sur toute leur longueur un nouveau cloisonnement qui isole de très courts articles (5 à 15 μ au lieu de 25 à 30 pour les thalles normaux). On observe bientôt, dans certains d'entre eux, les mêmes symptômes que ceux décrits au niveau d'anastomoses entre deux thalles incompatibles; cette réaction d'incompatibilité conduit, au début, à la mort de quelques articles largement dispersés dans la colonie, mais la proportion des articles morts s'accroît rapidement avec le vieillissement des thalles. Cependant, dans la très grande majorité des cas, certains articles échappent à ce processus et gardent, en dépit de leur taille réduite, une apparence normale; ils régénèrent bientôt dans les portions contiguës et mortes des hyphes, ou émettent de nouvelles ramifications. On peut isoler ces articles et les transplanter individuellement dans de nouvelles microgouttes; ils se développent alors en microthalles dont la vitesse de croissance, d'ailleurs très variable, est toujours réduite. L'apparition des réactions d'incompatibilité interrompt leur évolution après des temps de croissance beaucoup plus dispersés que chez les thalles issus des spores.

Quoi qu'il en soit, 3 à 4 jours plus tard, la croissance est totalement arrêtée et les articles restés sains se révèlent, à ce stade, incapables de régénérer.

Les trois types de souches auto-incompatibles se comportent de cette manière. Les différences dans le mode d'évolution des thalles C_1D, C_1E_2 et $B_1 + B_2$ portent essentiellement sur le moment d'apparition des premières réactions d'incompatibilité et sur la proportion des cellules qui meurent.

Dans le cas des thalles C_1E_2, la croissance est stoppée de 6 à 10 heures après la germination des spores. A ce stade, le mycélium est uniquement constitué par les deux ou trois hyphes primaires qui s'individualisent immédiatement après la germination. En règle générale, il ne subsiste au plus, que deux ou trois articles (Pl. II, *B*); lorsque l'incompatibilité survient très précocement, il n'en subsiste aucun.

Dans le cas des thalles C_1D, la croissance est perturbée 12 à 15 heures après la germination des spores; à ce stade, les hyphes secondaires sont très développées (Pl. II, *C* et *D*). L'incompatibilité affecte une proportion d'articles moindre que dans le cas des thalles C_1E_2.

La croissance des thalles hétérocaryotiques $B_1 + B_2$ s'arrête 10 à

12 heures environ après la germination, au stade où les hyphes primaires commencent à se ramifier. La mort des cellules survient presque exclusivement dans les portions hétérocaryotiques du mycélium, c'est-à-dire dans les filaments primaires. Les hyphes secondaires, homocaryotiques pour B_1 ou B_2, évoluent d'une manière normale.

b) Les thalles adultes.

Lorsque les thalles auto-incompatibles sont cultivés sur milieu gélosé, la phase initiale de croissance normale est beaucoup plus longue qu'en gouttelette pendante : 18 à 20 heures pour les souches C_1E_2 et 26 à 30 heures pour les souches C_1D, ce qui correspond, pour les colonies, à un diamètre voisin de 1,8 et 5 mm.

Cette croissance normale se termine par une période de crise, décelable par une diminution brutale de la vitesse de la croissance radiale des colonies; pour certains secteurs du front de la culture, la croissance des hyphes paraît même totalement arrêtée. Peu après, au centre de la culture, les hyphes se cloisonnent activement, quelques articles meurent, ce processus s'étendant ensuite à une fraction de plus en plus importante des cellules. On distingue donc, dans les colonies, deux zones très distinctes : une région centrale où les cellules meurent et une couronne externe d'hyphes apparemment saines, mais poussant d'une manière irrégulière et désordonnée. La zone de réaction gagne ensuite graduellement la périphérie de la colonie, tandis que l'extension radiale du thalle décroît de plus en plus.

Cependant, au contraire des mycéliums cultivés en gouttelette pendante, la croissance n'est pas stoppée au bout de 4 à 5 jours. On voit, en effet, apparaître dans les colonies C_1D et C_1E_2 des hyphes à croissance normale. Ces hyphes envahissent très rapidement les cultures qui prennent l'aspect de colonies normales. Par repiquage d'hyphes ou d'articles, on obtient d'emblée des mycéliums définitivement normaux. Cette étape de l'évolution des souches auto-incompatibles est totalement irréversible.

Nous avons essayé de voir si ces hyphes normales sont issues d'un nombre important ou limité de cellules, voire d'une seule. Cette étude était facilitée au départ par le fait que ces hyphes apparaissent après un temps d'évolution pratiquement constant : 4 jours pour les souches C_1D et 5 jours pour les souches C_1E_2. Cependant, nous n'avons pu arriver à une conclusion bien nette; il semble toutefois que ces hyphes apparaissent simultanément en divers points de la culture. Une étude antérieure, réalisée également sur une souche auto-incompatible, avait déjà abouti à une interprétation identique (Esser, 1959); ces hyphes normales paraissent également issues d'un certain nombre de points répartis dans la zone centrale des cultures.

La température n'a aucune influence sur l'évolution des souches C_1E_2. Elle a, au contraire et comme on pouvait s'y attendre, un effet

important sur l'évolution des souches C_1D. L'étude de l'effet de la température sur ces souches s'imposait puisque c'était la seule situation où l'on pouvait étudier directement l'interaction entre C_1 et D, indépendamment des C_1 et d.

Nous avons cultivé, dès la germination des spores, les mycéliums C_1D à quatre températures différentes : 14, 20, 28 (température la plus usuelle de culture) et 32°, et noté le moment d'apparition des premiers signes d'incompatibilité : diminution de la vitesse de croissance et mort des cellules (fig. 10). On voit qu'à 28° la diminution de la vitesse de la croissance précède de très peu l'apparition des réactions incompatibles dans le centre des cultures. Pour les autres températures, ces deux

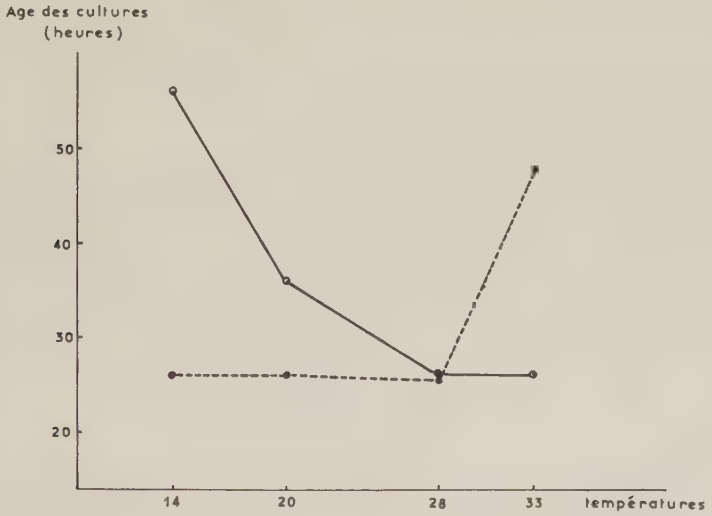


Fig. 10. — Influence de la température sur le délai de l'auto-incompatibilité pour les thalles C_1D. La courbe en trait plein traduit le moment d'apparition de l'incompatibilité cellulaire et la courbe en pointillé le moment d'apparition de la croissance réduite.

anomalies apparaissent décalées dans le temps : à 14°, les réactions d'incompatibilité ne se produisent que 30 heures après la diminution de la croissance; à 20°, cet intervalle est de 10 heures environ. A 32°, au contraire, la croissance des cultures est normale pendant plus de 48 heures, alors que des cellules mortes sont visibles au centre des cultures depuis plus de 24 heures.

La première manifestation d'interaction entre C_1 et D est donc, selon la température, soit la réduction de la croissance des souches, soit l'incompatibilité cellulaire. Cependant, quelles que soient les conditions de température, les souches C_1D aboutissent au stade ultime de leur évolution, c'est-à-dire à une croissance normale.

L'évolution des thalles hétérocaryotiques $B_1 + B_2$ est évidemment différente puisque les deux gènes antagonistes se trouvent dans deux

noyaux différents. On sait en effet que les deux constituants nucléaires des souches hétérocaryotiques normales se séparent au moment de l'individualisation des hyphes secondaires. Il n'est donc pas étonnant que les cultures $B_1 + B_2$ adultes soient constituées de secteurs homocaryotiques B_1 ou B_2 (cf. p. 626).

2° Discussion.

La croissance normale, obtenue au terme de l'évolution des souches auto-incompatibles et observée régulièrement sur milieu gélosé et jamais en gouttelette pendante, constitue un phénomène important sur lequel il sera intéressant de revenir, dès que nous aurons pu étudier plus en détail les deux phases précédentes de la croissance, toujours présentes quelles que soient les conditions de milieu. Parmi celles-ci, seule la première pose un problème nouveau.

Le fait le plus important est que la phase initiale de la croissance soit toujours normale. L'apparition, à un moment précis, des réactions d'incompatibilité signifie que les expressions des deux gènes antagonistes (C_1 et D, C_1 et E_2, B_1 et B_2) sont alors présentes, et vraisemblablement aussi que l'expression de l'un au moins des deux gènes était jusque-là absente. On peut alors se demander si cette apparition tardive du deuxième facteur cytoplasmique est normale ou si, au contraire, ce retard résulte de l'interaction spécifique entre gènes antagonistes.

Pour répondre à cette question, il nous faut savoir deux choses : 1° quel est, après la méiose, le moment « normal » d'apparition de chacun des facteurs cytoplasmiques, lorsqu'un gène antagoniste n'intervient pas dans le croisement (par exemple dans un croisement $C_1 \times C_4$ ou $D \times d$); 2° quel est le phénotype des jeunes thalles auto-incompatibles au moment où leur croissance est encore normale. Le premier problème est déjà résolu (cf. chapitre I, deuxième partie) et les résultats sont groupés dans le tableau XIII (p. 684). Chacun des gènes C_1, D, E_2, B_1, B_2 et S et s est toujours normalement exprimé très tôt après la germination des spores, lorsque le croisement n'implique pas des gènes antagonistes. Le fait qu'au même âge les thalles génotypiquement auto-incompatibles (C_1D, C_1E_2, $B_1 + B_2$) soient normaux indique donc qu'il y a une modification de l'expression phénotypique de ces gènes, due à l'interaction entre les gènes incompatibles. La recherche du phénotype de ces jeunes thalles est évidemment nécessaire à la compréhension de ces interactions.

B. — ANALYSE DE L'INTERACTION ENTRE LES DEUX GÈNES D'UN MÊME SYSTÈME DE BARRAGE AU COURS DU CROISEMENT ET DE LA CROISSANCE DES DESCENDANTS

1° Détermination du phénotype précoce des souches F_1.

Les diverses souches F_1 issues des hybridations entre souches incompatibles $C_1 \times D$, $C_1 \times E_2$, $B_1 \times B_2$ et $S \times s$ sont confrontées aux thalles parentaux 3 ou 4 heures après la germination des spores, donc à un stade où la croissance des souches auto-incompatibles est normale.

a) Résultats.

Les résultats correspondant à chacun des croisements sont groupés dans les tableaux suivants où la lettre N indique un contact normal avec les thalles parentaux, I, la présence d'une réaction d'incompatibilité et IR, celle d'une réaction d'incompatibilité différée. Les descendants de génotypes auto-incompatibles sont marqués d'un astérisque. Dans les trois premiers cas, les résultats sont indépendants du sens des croisements.

1° Croisement $C_1d \times C_4D$

Génotypes des souches F_1	*Confrontation avec les thalles parentaux*		*Phénotypes des souches* F_1
	C_1d	C_4D	
C_1d	N	I	[C_1]
C_4D	I	N	[D]
C_4d	N	N	—
C_1D^*	N	I	[C_1]

2° Croisement $C_1E_1 \times C_4E_2$

Génotypes des souches F_1	*Confrontation avec les thalles parentaux*		*Phénotypes des souches* F_1
	C_1E_1	C_4E_2	
C_1E_1	N	I	[C_1]
C_4E_2	I ou IR	N	[E_2]
C_4E_1	N	N	—
$C_1E_2^*$	N	I	[C_1]

3° Croisement $B_1 \times B_2$

Génotypes des souches F_1	*Confrontation avec les thalles parentaux*		*Phénotypes des souches* F_1
	B_1	B_2	
$B_1 + B_1$	N	I	$[B_1]$
$B_2 + B_2$	I	N	$[B_2]$
$B_1 + B_2^*$	I	N	$[B_2]$

4° Croisement $S \times s$.

L'exposé des résultats de ce croisement nécessite quelques précisions préalables. Normalement, ce croisement ne donne pas naissance à des descendants auto-incompatibles, mais les phénomènes que nous allons décrire nous aideront à préciser la nature des interactions entre gènes antagonistes.

Nous avons vu que les spores homocaryotiques $s^S + s^S$ issues des croisements $S \times s^S$ donnaient des thalles de phénotype [S] quelques heures après la germination des spores. Ultérieurement, le phénotype devient s^S, le facteur cytoplasmique S étant dilué au cours de la croissance. Il en est de même pour les descendants de génotype *s* issus des croisements ♀$S \times$ ♂s ou ♀$s \times$ ♂S lorsque les périthèces se développent à 28° C.

Cependant, lorsque la température au cours du développement des fructifications ♀$s \times$ ♂S est de 18°, les résultats sont tout différents. A cette température les périthèces hybrides contiennent en effet deux types d'asques : 1° des asques à quatre spores d'aspect normal; 2° des asques à deux spores normales et deux spores avortées, petites, blanches, granuleuses et ne germant pas. La fréquence moyenne des asques contenant deux spores avortées est de 5 % environ; cependant cette proportion varie : — avec les périthèces : certains en contiennent à peine 1 %, d'autres plus de 15 %; — avec le moment où les asques arrivent à maturité dans les périthèces : si l'on considère les 50 premiers asques formés sur l'ensemble des fructifications, le taux des asques anormaux est supérieur à 50 %; au contraire, les derniers asques formés par les périthèces sont tous normaux.

Les divers types de descendants des croisements ♀$s \times$ ♂S effectués à 28° et à 18° ont été confrontés, tôt après la germination, avec des thalles parentaux pour déterminer, comme précédemment, leur phénotype (voir tableau p. 693).

Il se produit donc, dans les asques à spores avortées formés à 18°, deux anomalies régulières : les descendants de génotype *s* sont de phénotype [s] et non s^S, ce qui signifie donc que l'expression phénotypique du gène *s* n'est pas supprimée comme elle l'est d'ordinaire; ce sont toujours les spores de génotype *S* qui avortent.

Génotypes des souches F_1	*Confrontation avec les thalles parentaux*		*Phénotypes des souches* F_1	
	S	*s*	Précoce	Définitif
1. 28°.				
$S + S$	N	I	[S]	[S]
$s + s$	N	I	[S]	s^S
2. 18°.				
a) Asques à spores normales :				
$S + S$	N	I	[S]	[S]
$s + s$	N	I	[S]	s^S
b) Asques à spores avortées :				
$S + S$	—	—	—	—
$s + s$	I	N	[s]	[s]

b) ***Conclusions et discussion.***

Il apparaît de l'ensemble de ces résultats, que, dans les jeunes thalles de génotype auto-incompatible issus des croisements $C_1 \times D$, $C_1 \times E_2$, $B_1 \times B_2$, un seul des deux gènes antagonistes se trouve phénotypiquement exprimé, et, pour un croisement donné, toujours le même (dans le cas particulier du croisement $♀s \times ♂S$ c'est, selon la température, soit le gène *s*, soit le gène *S* dont l'expression phénotypique est seule présente chez les descendants). D'autre part, il est intéressant de remarquer, en comparant ces résultats à ceux du tableau XIII (p. 684) que, dans le cas des interactions C_1E_2 et C_1D, ce sont les gènes qui normalement commencent à s'exprimer le plus tard après la méiose qui voient leur expression inhibée par le gène C_1, plus précoce.

L'inhibition de l'expression de l'un des deux gènes permet évidemment de comprendre pourquoi la croissance des mycéliums C_1D, C_1E_2 et $B_1 + B_2$ est d'abord normale. Il nous reste à préciser à quel moment s'opère cette inhibition régulière de l'expression de l'un des deux gènes antagonistes par l'autre, et également dans quelles conditions elle se trouve levée après un certain temps de croissance.

2° Recherche des premières manifestations de l'interaction entre gènes antagonistes.

Nous venons de voir que, sur les très jeunes cellules des thalles issus des ascopores, l'inhibition de l'expression de l'un des gènes est chose faite. Si aucune anomalie ne s'observe avant la germination des spores, il est très difficile de préciser quand, où, comment, l'inhibition

a commencé. Mais dans deux cas, nous observons des anomalies dans la formation des spores, dont l'étude va nous apporter des informations intéressantes : il s'agit des croisements $C_1 \times D$ et des croisements $♀s \times ♂S$ réalisés à 18°.

a) Cas du croisement $C_1 \times D$.

On trouve dans les périthèces hybrides $C_1d \times C_4D$ des ascospores de taille réduite. Lorsque la température au cours du développement des fructifications est voisine de 20°, 99 % des asques comportent deux spores de taille réduite, toujours situées dans la même demi-tétrade, le reste étant constitué d'asques comprenant quatre spores de taille réduite. A l'exception des spores hétérocaryotiques $C_1d + C_4D$, toutes les spores D, et elles seulement, sont anormales, qu'elles comportent ou non le gène C_1 (cf. p. 647). A 32°, au contraire, les ascospores des périthèces hybrides sont toutes normales. Pour des températures intermédiaires, on trouve, soit quatre spores normales, soit une ou deux spores de taille réduite. Nous avons cherché à préciser le déterminisme de la répartition irrégulière dans les asques de ce type d'anomalie.

Lorsque la température au cours du développement des fructifications $C_1d \times C_4D$ est de 25°, on trouve essentiellement trois types morphologiques d'asques : certains ne contiennent que des spores normales (type 1), d'autres renferment soit une, soit deux spores de taille réduite situées dans le même demi-asque, et que nous appellerons respectivement types 2 et 3. Nous avons examiné et mesuré les ascospores de 391 asques; ces spores ont été ensuite individuellement semées afin de déterminer leur génotype.

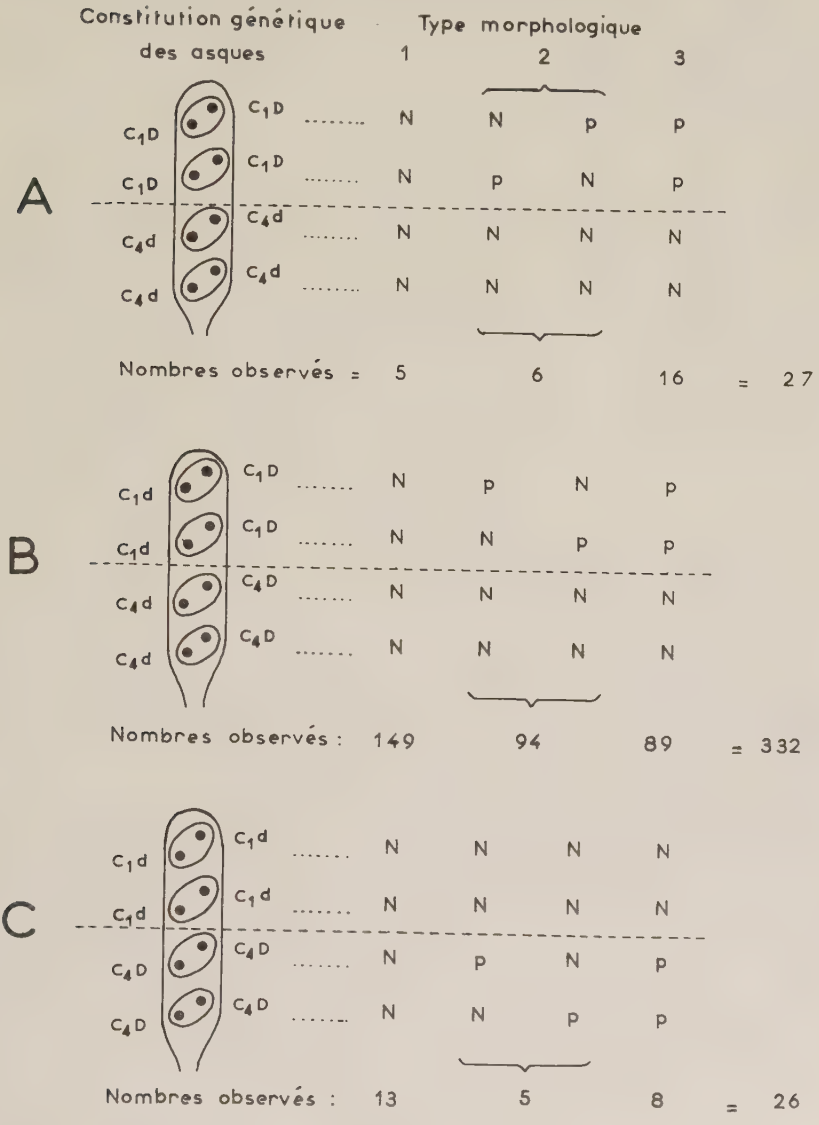
Comme le couple C_4C_1 est rarement post-réduit, les trois catégories génétiques d'asques sont déterminées par la pré-réduction ou la post-réduction du couple $D\,d$: on trouve, en effet, deux catégories de fréquence réduite (l'une comprenant des asques « ditypes parentaux », l'autre des « ditypes recombinés ») et une troisième, plus abondante, constituée d'asques « tétratypes ».

1° ***Résultats.*** — *a)* Asques ditypes recombinés (tableau XIV, *A*) : les spores binucléées sont soit $C_1D + C_1D$, soit $C_4d + C_4d$. Les spores de taille réduite sont toujours les spores $C_1D + C_1D$; sur 54 spores de ce génotype, 38 étaient de taille réduite.

b) Asques tétratypes (tableau XIV, *B*) : cette catégorie très abondante d'asques permet une étude plus détaillée du phénomène. Retenons pour le moment que les spores $C_1D + C_1d$ peuvent être de taille réduite, alors que les spores $C_4d + C_4D$ sont toujours normales.

c) Asques ditypes parentaux (tableau XIV, *C*) : les spores binucléées sont, dans ce cas, soit $C_1d + C_1d$, soit $C_4D + C_4D$. Les premières sont toujours normales. Sur 52 spores $C_4D + C_4D$, 21 étaient de taille réduite.

TABLEAU XIV. — RÉPARTITION DES SPORES DE TAILLE RÉDUITE DANS LES ASQUES $C_1d \times C_4D$.



2° ***Discussion.*** — Cette étude n'apporte aucune précision nouvelle quant aux génotypes des spores qui peuvent être de taille réduite. Cependant, ces résultats soulèvent plusieurs questions.

On peut tout d'abord se demander si le fait que, dans un même demi-asque de constitution génétique homogène, on trouve 0, 1 ou 2 spores de taille réduite, résulte d'un événement aléatoire de probabilité donnée et indépendante pour chaque spore ou si, au contraire,

les deux spores du même demi-asque tendent à avoir le même phénotype, ce qui voudrait dire que la taille normale ou réduite est déterminée avant la délimitation de la spore. On peut tenter de répondre à cette question en étudiant le cas des spores $C_1D + C_1d$ des asques tétratypes (tableau XIV, *B*).

La probabilité calculée pour qu'une spore $C_1D + C_1d$ se formant à 25° soit de taille réduite est :

$$p = \frac{94 + 2 \times 89}{332 \times 2} = 0{,}41$$

p présente donc la probabilité pour que l'interaction entre les gènes C_1 et D se manifeste par une diminution de la taille de la spore. Si la taille de deux spores $C_1d + C_1D$ d'un même asque est déterminée de manière indépendante, on peut calculer la répartition théorique des trois types d'asques.

	Fréquences théoriques		*Nombres observés*
Type 1	$332\ (1-p)^2$	= 115,7	149
Type 2	$332.2.p\ (1-p)$	= 160,6	94
Type 3	$332.p^2$	= 55,8	89

Ces deux distributions diffèrent très significativement ($\chi^2 = 75$ pour un degré de liberté). Les deux spores $C_1d + C_1D$ d'un même asque sont donc plus souvent que prévu de la même taille que de taille différente. On peut en conclure que ce caractère des spores est assez souvent déterminé avant que leur cytoplasme soit délimité.

On peut aussi calculer la probabilité (x) avec laquelle l'aspect des spores est prédéterminé avant leur isolement; dans ce cas, les deux spores de l'asque sont de même taille, soit normales, soit de taille réduite avec des probabilités qui sont respectivement de $1-p$ et p. Dans le cas où ce caractère est déterminé plus tard (probabilité $1-x$), les deux spores peuvent être soit de la même taille, ou normales $(1-p)^2$ ou de taille réduite (p^2), soit de taille différente $(2.p.(1-p)^2)$. La fréquence des trois types d'asques devient alors :

— pour le type 1 : $x\,(1-p) + (1-x)\,(1-p)^2$

— pour le type 2 : $(1-x)\,2\,.\,p\,.\,(1-p)$

— pour le type 3 : $x\,.\,p\,. + (1-x)\,p^2$

p étant connu, la résolution de ce système en fonction des données expérimentales permet de calculer x : $x = 0{,}42$.

Ainsi, dans 40 % des cas environ, la taille des spores $C_1d + C_1D$ est déterminée dans l'asque avant leur délimitation.

Le second problème soulevé par les résultats précédents est de comprendre pourquoi cette anomalie, qui résulte de l'interaction entre C_1 et D, n'affecte que les spores D. Cette particularité est explicable. Nous savons en effet que les facteurs associés au gène C_1 diffusent dans le

cytoplasme de l'asque avant la délimitation des spores. Comme les facteurs D ne paraissent formés qu'après la délimitation des spores, les spores de génotype C_1 ne portant pas le gène D ne risquent pas de contenir le facteur D. Le cas des asques ditypes parentaux où les spores normales sont $C_1d + C_1d$ et les spores anormales $C_1D + C_1D$ supporte bien cette interprétation.

On peut enfin se demander quelle est la nature des déterminants participant à l'interaction entre C_1 et D qui aboutit à la réduction de la taille des spores. S'agit-il en particulier d'une interaction modérée non létale entre les facteurs cytoplasmiques C_1 et D ? Ceci indiquerait évidemment que le facteur D est synthétisé dans la spore après sa délimitation.

Pour répondre à cette question, nous envisagerons l'effet de la température au cours du développement des périthèces sur cette anomalie des spores. En effet, la probabilité pour qu'une spore $C_1D + C_1d$ soit de taille réduite est voisine de l'unité à 20°, quasi nulle à 32°. Or, on se rappelle que l'affrontement des facteurs cytoplasmiques C_1 et D détermine soit une réaction immédiate, soit une réaction à effet retardé, selon que les intermédiaires cytoplasmiques du gène D sont synthétisés à 20° ou à 32°. On voit donc que c'est à la température où les facteurs D donnent une réaction retardée que les spores $C_1D + C_1d$ ont une taille normale; inversement, ces spores sont toujours de taille réduite à la température où les facteurs D donnent une réaction immédiate. Ce parallélisme rend très vraisemblable que la réduction de taille des spores résulte d'une interaction entre facteurs C_1 et D. De plus, on peut considérer que la diminution de la taille des spores dépend uniquement des propriétés des intermédiaires cytoplasmiques du gène D car, si ce phénomène dépendait aussi du gène C_1, la proportion des spores C_1 de taille réduite devrait être constante. Ce n'est pas le cas, puisque cette anomalie a une probabilité de 0,41 pour les spores $C_1D + C_1d$ et de 38/54, soit 0,70 pour les spores $C_1D + C_1D$. Dans l'hypothèse contraire, on peut calculer la fréquence théorique des spores $C_1D + C_1D$ qui devraient être de taille réduite. En effet, 0,41 correspond à la probabilité pour qu'un seul gène D (cas des spores $C_1D + C_1d$) conduise à cette anomalie. Dans ce cas, étant donné que les spores $C_1D + C_1D$ contiennent deux gènes D, on peut prévoir la fréquence de celles qui seront de petite taille : c'est-à-dire $1 - (1 - 0{,}41)^2$, soit 0,65. Compte tenu du faible effectif des spores $C_1D + C_1D$ (54), cette fréquence correspond bien à la fréquence observée (0,70).

Il semble donc que le facteur D est synthétisé seulement dans les spores, ce qui est tout à fait conforme à ce que nous avons vu précédemment dans les croisements $D \times d$ (cf. p. 681), où l'expression phénotypique [D] n'est jamais présente avant la délimitation des spores. La taille des spores D ne dépend alors que des propriétés de l'intermédiaire du gène D synthétisé dans ces spores.

L'hypothèse que la réduction de taille des spores D résulte d'interaction entre facteurs cytoplasmiques C_1 et D ne simplifie pas notre

recherche du moment auquel s'opère la suppression de l'expression phénotypique [D] pour les jeunes thalles auto-incompatibles C_1D. Cependant, l'hypothèse selon laquelle le gène D serait effectivement exprimé dans la spore, bien qu'il apparaisse par la suite inhibé, se trouve étayée par un autre fait.

Nous avons vu en effet que les seules spores de génotype D à n'être jamais de taille réduite étaient les spores hétérocaryotiques $C_1D + C_1d$. Or, nous avons vu précédemment que dans les hétérocaryons $C_1D + C_1d$ issus des périthèces hybrides $C_1D \times C_1d$, le facteur cytoplasmique D se trouve raréfié. Le fait que les seules spores qui ne présentent jamais une taille réduite aient le génotype correspondant aux souches qui, au cours de leur croissance végétative, contiennent peu de facteur D, nous paraît un bon argument en faveur de l'interprétation avancée.

Le cas des hétérocaryons $C_1D + C_1d$ permet également de préciser le caractère très particulier de l'interaction entre les gènes D et d. Tout confirme que l'expression phénotypique [D] est déjà déficiente dès la maturation des spores. L'interaction entre ces deux gènes se traduit également au cours de la croissance végétative par la raréfaction des noyaux D. Nous ignorons évidemment si ces deux manifestations, inhibition de l'expression [D] et diminution de l'activité auto-catalytique des noyaux D, sont liées; nous savons cependant que la première manifestation apparaît précocement.

En résumé, c'est la synthèse du facteur cytoplasmique D dans les spores de génotype D qui rend compte, par suite de l'interaction de ce facteur avec le facteur C_1 diffusé dans le cytoplasme de l'asque, de la taille réduite de ces spores. Mais, comme l'interaction des deux facteurs ne conduit pas à la mort des spores C_1D et que les jeunes thalles issus de celles-ci ne contiennent plus de facteur D, on peut admettre que, sous l'influence du gène C_1, l'expression du gène D se trouve très vite inhibée, dès avant la germination des ascospores. Cette inhibition requiert toujours la présence dans la spore du gène C_1 : nous avons vu en effet (cf. p. 691) que la simple diffusion du facteur dans le cytoplasme des spores $C_1D + C_1D$, qui entraîne également une diminution de leur taille, ne suffit pas à rendre déficiente, dès la germination des spores, l'expression phénotypique [D] des jeunes souches C_1D.

b) Cas du croisement ♀s × ♂S réalisé à 18°.

Nous avons vu que dans la descendance du croisement $♀s \times ♂S$ à 18°, on trouvait des asques à deux spores avortées, les deux normales donnant des thalles [s].

On sait que ce qui détermine le phénotype [s] ou s^s d'une cellule de génotype s est la présence ou l'absence du facteur cytoplasmique s et le fait que, normalement, tous les decendants de génotype s issus de croisements $S \times s$ soient s^s, a été interprété comme le résultat de l'inhibition durable de l'expression phénotypique du gène s sous

l'action du gène *S* (Beisson-Schecroun, 1962). Nous avons vu que le gène *S* s'exprimait avant la délimitation des spores et, par analogie avec ce que nous avons vu de l'inhibition des gènes *D* et E_2 par le gène C_1, il est tentant de supposer que cette inhibition régulière de l'activité du gène *s* sous l'influence de son allèle *S* résulte du fait qu'après la méiose, le gène *S* commence à s'exprimer le premier. La situation est donc, au moins au début, identique à celle décrite pour l'interaction B_1B_2 par exemple; mais le fait que les jeunes thalles de génotype $S + s$ ne soient pas auto-incompatibles résulte uniquement du fait que le gène *s* a la propriété particulière, une fois son expression phénotypique supprimée, de se maintenir stable sous sa forme inhibée.

Mais à 18°, l'expression phénotypique du gène *s* n'est pas toujours supprimée et ceci a pour corollaire la mort des spores de génotype *S*. Il est possible que cette mort soit le résultat d'une réaction d'incompatibilité, ce qui signifie que les facteurs cytoplasmiques S et s se sont trouvés mélangés dans les spores de génotype *S*. On peut aussi supposer que la mort des spores *S* résulte d'un processus tout à fait différent. En effet, on a déjà montré, en anastomosant un très court article *S* à une hyphe *s*, que la prédominance des facteurs s avait pour effet de provoquer, non pas une réaction d'incompatibilité, mais l'élimination des noyaux *S* (*loc. cit.*); on a alors supposé que cette élimination des noyaux *S* résultait de l'inhibition de l'expression [S]. Si l'on admet qu'après une méiose, l'inhibition d'un gène d'incompatibilité donné, sous l'action du gène antagoniste plus précocement actif, est un phénomène général (comme c'est le cas pour les gènes *D* et E_2 sous l'influence du gène C_1), on peut penser que c'est l'inhibition de l'expression [S] qui entraîne la mort des spores *S*. Quelle que soit l'hypothèse retenue, ces faits ne peuvent s'expliquer que si, à 18°, le gène *S* a tendance à s'exprimer plus tardivement que dans les conditions normales; alors non seulement son expression n'est pas assez précoce pour prévenir la reprise d'activité du gène *s*, mais elle est même suffisamment tardive pour laisser le temps au facteur s de diffuser dans tout l'asque.

En résumé, dans les périthèces hybrides $♀s \times ♂S$, le phénotype des descendants dépend essentiellement de celui des deux gènes qui s'exprime le plus tôt, le gène le plus précoce étant toujours capable d'inhiber l'expression de l'autre.

c) Conclusions.

L'étude des deux cas d'anomalie dans la formation des spores, lors d'un croisement impliquant deux gènes incompatibles, nous a permis de préciser : 1° que pour chaque couple de gènes, l'un est capable d'inhiber l'expression phénotypique de l'autre; 2° que cette propriété

du gène « dominant » tient à ce qu'il commence à s'exprimer plus tôt au cours de l'histoire de l'asque.

Nous allons voir maintenant comment les différents gènes réagissent à cette inhibition de leur expression.

3° Le devenir des thalles auto-incompatibles : réapparition de l'expression de gènes E_2, D *et* B_1 *et phénotype définitif.*

Nous avons déjà étudié la période juvénile de l'évolution des souches auto-incompatibles caractérisée par une croissance normale. Il reste à envisager maintenant les deux autres étapes successives de la croissance : la phase de crise où les réactions d'incompatibilité apparaissent et s'étendent à une grande partie des cellules et, enfin, la nouvelle phase de croissance définitivement normale qui ne s'établit que si les mycéliums C_1E_2 et C_1D sont cultivés sur milieu gélosé.

Nous envisagerons ensuite brièvement le devenir des thalles hétérocaryotiques $B_1 + B_2$.

a) Cas des gènes D *et* E_2.

1° La réapparition des expressions phénotypiques [D] *et* [E_2]. — Comme le phénotype des jeunes thalles C_1D et C_1E_2 est uniquement [C_1], l'apparition de l'auto-incompatibilité dans ces cultures ne dépend que d'un seul événement : l'apparition des facteurs cytoplasmiques D et E_2. C'est vraisemblablement ce qui se produit lorsque les cellules des thalles C_1D et C_1E_2 meurent après 15 heures de croissance environ pour les premiers, 6 à 10 heures pour les seconds, lorsque ces deux mycéliums sont cultivés en gouttelette pendante. Sur milieu gélosé, ces événements se produisent plus tardivement : après plus de 26 heures pour les souches C_1D et 18 heures pour les souches C_1E_2.

En gouttelette pendante, l'étude du déterminisme de l'apparition de l'expression phénotypique [E_2] n'est pas aisée en raison du délai assez court qui la sépare de la germination des spores. Au contraire cette étude est possible, dans ce même milieu, pour les thalles C_1D.

En effet, par des repiquages successifs d'articles, prélevés de 10 heures en 10 heures sur les thalles C_1D, on peut maintenir les colonies C_1D en phase de croissance normale : le phénotype de ces thalles reste toujours [C_1] et l'expression phénotypique [D] absente. Cependant, après 15 heures d'évolution, chacun des microthalles devient auto-incompatible, ce qui matérialise la réapparition constante de l'expression [D].

On peut remarquer que le rythme minimum des repiquages qui permet d'entretenir cet état juvénile est semblable au rythme des isolements d'articles qui permet de conserver aux hyphes C_1d le niveau

élevé, « juvénile », de concentration du facteur C_1 (cf. chapitre I, p. 682).

Nous avons confronté à des mycéliums hétérocaryotiques $C_1d + C_4D$, choisis comme indicateurs du niveau relatif de la concentration du facteur C_1, soit de jeunes mycéliums C_1D issus des spores et âgés de 10 heures, soit des thalles obtenus à partir d'articles prélevés sur les cultures précédentes, soit enfin les microthalles obtenus à partir des articles des mycéliums C_1D âgés qui régénèrent; dans tous les cas, les réactions d'incompatibilité se produisent immédiatement après les anastomoses. Autrement dit, chaque fois que l'expression phénotypique [D] est absente d'une cellule ou d'un thalle C_1D, la concentration du facteur C_1 est au niveau le plus élevé.

On peut réaliser des opérations assez semblables lorsque les thalles C_1E_2 et C_1D sont cultivés sur milieu gélosé. Bien qu'elles n'apportent pas les mêmes précisions, en ce qui concerne notamment les conditions où l'expression phénotypique [D] apparaît, on retrouve sous une forme très voisine les mêmes phénomènes. En effet, si l'on repique des semis prélevés sur les souches C_1D et C_1E_2 avant l'apparition des réactions d'incompatibilité, on peut, par des transplantations identiques réalisées à ce rythme, maintenir ces deux souches à un rythme de croissance identique à celui des souches normales. Tous ces microthalles réalisent l'auto-incompatibilité : après 18 heures de croissance pour les souches C_1E_2, après 24 heures pour les cultures C_1D. On peut aussi, et contrairement au cas des thalles cultivés en gouttelette pendante, réaliser le rajeunissement des thalles à partir des cellules saines prélevées sur des thalles plus âgés qui manifestent l'auto-incompatibilité. Tout paraît donc confirmer que l'on peut, par cette technique, maintenir supprimées les expressions phénotypiques des gènes D et E_2.

2° ***La suppression définitive des expressions*** [D] ***et*** [E_2]. — Les secteurs à croissance normale apparaissent, au sein des colonies, 4 jours après la germination des spores pour les thalles C_1D, 5 à 6 jours pour les thalles C_1E_2. Chacune des cultures obtenues, soit à partir des cellules isolées sur les thalles dans la phase juvénile de leur croissance, soit à partir des cellules saines des thalles qui réalisent l'auto-incompatibilité, évolue vers ce terme ultime dans le même délai. C'est toujours 3 jours après la réalisation de l'auto-incompatibilité que ces secteurs normaux apparaissent dans les cultures C_1D; c'est 1 à 2 jours plus tard pour les thalles C_1E_2.

Nous avons isolé des hyphes et des cellules dans des secteurs normaux : le phénotype des différents clones obtenus est uniquement [C_1]. Tout se passe donc comme si les expressions [D] et [E_2] étaient définitivement supprimées. Ces nouvelles cultures ont été croisées avec les souches parentales C_1d et C_4D d'une part, et C_1E_1 et C_4E_2 de l'autre. Dans la descendance de tous ces croisements, tout se passe comme si les gènes D et E_2 avaient « muté » en des états amorphes que nous

appellerons D' et E'_2. Des modalités identiques, concernant la croissance des souches auto-incompatibles et la « mutation » de l'un des gènes responsables, avaient déjà été signalées chez *Podospora anserina* (Esser, 1959). Il semble donc qu'il s'agisse là de phénomènes assez généraux.

Contrairement au gène D, pour lequel on ne connaît qu'un seul allèle, d, dont l'expression phénotypique n'est pas connue, nous avons la possibilité de tester l'expression phénotypique correspondant à E'_2, grâce aux gènes du locus C qui sont incompatibles avec l'un ou l'autre des allèles du locus E (cf. p. 660). Les résultats montrent que E'_2 n'est incompatible ni avec C_2 et C_4 : E'_2 paraît donc être amorphe. Nous avons aussi étudié la souche auto-incompatible obtenue en réunissant les gènes C_1 et E_3. Nous n'avons pas parlé de ces souches qui évoluent comme les souches C_1E_2 : dans la phase juvénile, C_1 inhibe l'expression $[E_3]$ et, au stade adulte, E_3 « mute » en un gène appelé E'_3. Comme E'_2, E'_3 est compatible avec tous les allèles connus au locus C.

La mutation apparente du gène D doit être reliée à la transformation héréditaire de ce gène déjà signalée à propos de l'étude des souches hétérocaryotiques $C_1D + C_1d$ (cf. p. 641). Dans le cas de post-réduction du couple $+/-$ on peut suivre, d'après la répartition des fructifications et l'étude de leur descendance, le devenir des noyaux C_1D; le groupement des fructifications au centre de la culture traduit l'élimination, au cours de la croissance, des noyaux C_1D. L'étude des descendants révèle la transformation du gène D en un gène amorphe identique à celui des thalles homocaryotiques C_1D; cependant, le fait que ces fructifications, au nombre d'une dizaine environ, soient assez bien réparties dans la zone centrale des cultures, confirme que la transformation de D en D' n'est pas un événement rare, puisque, en dépit de la contre-sélection des noyaux C_1D, elle s'est très vraisemblablement produite plusieurs fois.

b) Cas du gène B_1.

Nous avons vu que les jeunes thalles hétérocaryotiques $B_1 + B_2$ étaient, au début de leur croissance, uniquement de phénotype $[B_2]$. L'auto-incompatibilité des cultures correspond donc à l'apparition de l'expression $[B_1]$. Comme l'on sait déjà que les noyaux des mycéliums hétérocaryotiques, même chez les souches normales, se séparent dès l'individualisation des hyphes secondaires, la localisation et le caractère transitoire des réactions d'incompatibilité dans le cas des souches $B_1 + B_2$ ne peut surprendre. L'auto-incompatibilité ne concerne en effet que les hyphes primaires issues directement de la germination des spores qui sont les seules à contenir en mélange les deux noyaux porteurs des gènes antagonistes. La séparation ultérieure des noyaux aboutit à la formation de secteurs homocaryotiques B_1 ou B_2. Nous

n'avons jamais constaté la prédominance de l'un ou l'autre type de secteur.

Ainsi la suppression de l'expression phénotypique [B_1] est transitoire et n'entraîne aucune diminution de la vitesse de multiplication des noyaux.

c) Conclusions.

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que la première phase normale de croissance des thalles auto-incompatibles correspondait à une période d'inhibition de l'expression d'un des deux gènes antagonistes le plus précocement exprimé (C_1 dans le cas des interactions C_1D et C_1E_2 par exemple). Nous venons de montrer que, pour les souches C_1D et C_1E_2, cette inhibition est levée à un stade qui correspond à celui où la concentration du facteur C_1 décroît. Pour les hétérocaryons $B_1 + B_2$, l'inhibition du gène B_1 est levée peu après la différenciation des hyphes secondaires homocaryotiques, c'est-à-dire à un stade où l'on peut supposer que, au niveau des hyphes ne contenant que des noyaux B_1, la concentration du facteur B_2 devient plus faible.

Nous avons montré, d'autre part, que la phase adulte à croissance normale, obtenue au terme du développement des thalles C_1D et C_1E_2, résultait de l'inhibition définitive des gènes D et E_2. Cette inhibition définitive a les caractères d'une véritable mutation vers un état amorphe.

C. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1° Lorsqu'on étudie le résultat des fécondations réussies entre deux mycéliums incompatibles, on constate que les processus sexuels, depuis la fécondation jusqu'à la germination des ascospores, s'effectuent dans leur ensemble normalement, comme si les interactions entre les gènes antagonistes étaient affaiblies ou ne se manifestaient pas du tout. Ceci s'explique par le fait que les interactions entre gènes antagonistes entraînent une modification de leur expression.

2° On a pu préciser que ces modifications consistent toujours en l'inhibition de l'expression phénotypique de l'un des deux gènes. Cette inhibition, qui se réalise au plus tard pendant le développement des ascospores, est spécifiquement provoquée par celui des deux gènes incompatibles qui s'exprime le plus rapidement après la méiose. Si le moment d'apparition de l'expression d'un gène est une caractéristique de celui-ci, on comprend que cette inhibition soit unilatérale et indépendante du sens du croisement.

L'étude des croisements ♀s × ♂S réalisés à 18° est, à cet égard, particulièrement intéressante car elle montre que l'inhibition peut

s'exercer au détriment de l'un ou l'autre des deux gènes selon que, dans un asque, c'est le gène *S* ou le gène *s* qui est le premier phénotypiquement exprimé. Cette réciprocité des effets pour les gènes *S* et *s* laisse supposer que l'inhibition d'un gène n'est pas due à son inaptitude à inhiber l'autre, mais à une cause extrinsèque, à savoir que, dans les conditions étudiées, ce gène s'exprime plus tardivement que l'autre.

3° Ce processus prévient efficacement la reprise d'activité d'un gène d'incompatibilité. Dans ce cas, il n'y a jamais d'anomalies au cours du développement de l'asque et des ascospores. Cependant, dans certains cas, cette inhibition n'est pas réalisée immédiatement. Ainsi, la présence du gène C_1 dans une spore *D* n'exclut pas une synthèse, d'ailleurs transitoire, des facteurs associés au gène *D*, ce qui se traduit par une perturbation dans le développement des spores.

4° Le résultat de ces inhibitions est variable et paraît dépendre de propriétés spécifiques du gène inhibé. La suppression de l'expression [s] est réalisée d'emblée et se maintient parfaitement stable; cependant, elle reste réversible à tous les âges d'un thalle s^s. L'inhibition des expressions $[B_1]$, [D] ou $[E_2]$ sous l'effet des gènes B_2 et C_1 est temporaire, mais de durée différente. Pour les gènes *D* et E_2, cette première suppression de leur expression est suivie d'une inhibition définitive prenant tous les caractères d'une mutation qui pourrait correspondre à une inactivation irréversible. Enfin, le cas du gène *S* est très particulier : son inhibition paraît incompatible avec la survie des noyaux.

Chaque gène d'incompatibilité semble donc se caractériser, outre son rythme propre d'activité et la spécificité du facteur cytoplasmique associé, par sa sensibilité à l'inhibition sous l'action du gène antagoniste et par sa réponse particulière à cette inhibition.

CHAPITRE III

L'INCOMPATIBILITÉ SEXUELLE

Après ce que nous venons de voir dans les chapitres précédents, on pouvait se demander si l'échec ou la réussite des fécondations entre souches incompatibles dépendait également des modalités particulières de l'expression phénotypique des différents gènes au niveau des gamètes : microconidies et protopérithèces. En effet si, par exemple dans un croisement $♀B_1 \times ♂B_2$, les facteurs cytoplasmiques B_2 sont absents des microconidies et ne commencent à être synthétisés qu'après la délimitation des spores, on conçoit que toutes les étapes de la fécondation puissent être normales, les anomalies dues à l'interaction des deux gènes ne se manifestant qu'au moment de la germination des spores hétérocaryotiques $B_1 + B_2$. Au contraire, pour les croisements stériles, l'incompatibilité sexuelle déterminée par les gènes de barrage aurait alors non seulement le même déterminisme génétique que les autres manifestations de l'incompatibilité, mais serait due à la même interaction létale entre facteurs cytoplasmiques.

Pour éclaircir ce point, nous avons étudié les interactions au niveau des éléments sexuels dans le cas de divers couples de gènes de barrage.

A. — DÉFINITION DES DIFFÉRENTS TYPES DE CROISEMENTS

Lorsqu'un seul système élémentaire d'incompatibilité est en jeu dans un croisement, trois situations sont possibles : fertilité normale, stérilité totale ou stérilité partielle. Rappelons que pour toutes ces interactions, la fertilité de l'un au moins des deux croisements réciproques est normale.

1° Les croisements fertiles.

Dans cette catégorie se rangent notamment les croisements $♀C_1 \times ♂D$, $♀C_1 \times ♂E_2$, $♀R_2 \times ♂R_1$ et les deux croisements réciproques $B_1 \times B_2$ et $S \times s$.

A priori, l'appartenance d'un certain nombre de ces croisements à cette catégorie peut comporter une légère part d'arbitraire. En effet, les techniques expérimentales usuelles ne permettent pas forcément de déceler des taux très faibles de stérilité dont les valeurs se situeraient entre 1 et 2 %. Cependant, les résultats suivants montrent que tous ces croisements appartiennent à une catégorie très homogène.

1° La fertilité de tous ces croisements est toujours identique, quelles que soient les conditions de milieu, à celle des croisements entre souches de même génotype.

Nous avons, en particulier, étudié l'effet d'un allongement artificiel du processus sexuel, depuis l'apport des microconidies jusqu'à la formation des asques. Il suffit pour cela de placer, après la spermatisation, les cultures à 7°, température à laquelle les protopérithèces fécondés arrêtent leur évolution. Si l'on place les cultures fécondées pendant plusieurs jours à cette température, 12, 18, 24, 36 ou 48 heures après la spermatisation, l'évolution des fructifications se trouve interrompue à divers stades de leur développement. Dans aucun cas, la fertilité des croisements entre ces mycéliums incompatibles n'a été inférieure à celle des croisements réalisés entre souches de même génotype subissant un traitement identique.

2° Les périthèces hybrides évoluent aussi rapidement et contiennent le même nombre d'asques que les fructifications témoins.

Il semble donc que, dans ces cas, la coexistence des deux gènes d'incompatibilité n'entrave aucune étape des phénomènes sexuels, depuis la pénétration du noyau mâle dans le trichogyne jusqu'à la formation des asques.

2° Les croisements stériles ou partiellement stériles.

Nous considérons comme stériles les croisements dont la fertilité relative calculée est inférieure à 0,01 %. Nous envisagerons essentiellement dans cette catégorie le croisement $♀E_2 \times ♂C_1$ dont la fertilité est inférieure à 0,001 %.

L'ensemble des croisements pour lesquels la fertilité est visiblement partielle est plus complexe. Cette catégorie comprend en effet des croisements dont les degrés de fertilité dépendent des conditions de milieu et notamment de la température. Pour la commodité de l'inter-

prétation, nous avons éliminé de notre étude des croisements à fertilité trop réduite qui équivalent sensiblement à des croisements stériles : il s'agit, notamment, du croisement $♀Z_1 \times ♂Z_2$ (cf. fig. 4, p. 647) dont le taux des fécondations réussies est de l'ordre de 0,4 %. Nous avons seulement retenu les croisements $♀R_1 \times ♂R_2$ et $♂D \times ♀C_1$, dont les degrés de fertilité dans les conditions usuelles de température (26° environ) sont respectivement de 10 et 15 %.

Divers problèmes se posent lorsqu'il y a stérilité totale ou partielle :

1° à quels stades des processus sexuels l'incompatibilité se manifeste-t-elle ?

2° l'échec de la fécondation dépend-il de la microconidie, du protopérithèce ou des deux éléments à la fois ?

Nous allons voir, en étudiant quelques exemples, que la réponse à ces questions varie avec les gènes d'incompatibilité.

B. — LA STÉRILITÉ EST DUE AUX PROPRIÉTÉS DE LA MICROCONIDIE

1° Cas du croisement $♀E_2 \times ♂C_1$.

Esser (1959), dans un cas de stérilité observé dans le croisement entre les souches collectives M et s, a montré que le contact entre la microconidie et le trichogyne est rapidement interrompu par la dégénérescence de l'élément mâle. Bien que nous n'ayons pas déterminé avec autant de précision le moment où le processus sexuel est interrompu, les observations effectuées sur des protopérithèces E_2, antérieurement et postérieurement à leur spermatisation par des microconidies C_1, nous conduisent à la même conclusion.

1° Après l'apport des microconidies C_1, la taille d'une large proportion des protopérithèces d'une culture E_2 s'accroît très sensiblement. Le diamètre de ces protopérithèces devient supérieur à 50 μ et peut atteindre jusqu'à 70 μ, alors que, dans des cultures non fertilisées, le diamètre des protopérithèces varie seulement de 25 à 35 μ (Pl. I, *B*, et II, *E*).

2° Lorsqu'on utilise des suspensions de microconidies C_1 ou E_2 de concentrations sensiblement équivalentes, le nombre des protopérithèces E_2 qui subissent, dans le premier cas, un accroissement de leur taille est égal au nombre des périthèces formés dans le second.

3° La fertilité d'une culture E_2 spermatisée une première fois par des microconidies C_1, puis 24 ou 48 heures plus tard, par des microconidies E_2, est la même que celle d'une culture E_2 spermatisée par des microconidies E_2. Nous avons également pu vérifier, en suivant l'évolution des protopérithèces, que ceux dont la taille s'est accrue

après l'apport des microconidies C_1 sont réellement fécondés par les microconidies E_2.

Il semble donc que l'échec de la fécondation ne résulte pas d'un manque d'affinité entre le trichogyne E_2 et la microconidie C_1, mais d'un arrêt du processus de fertilisation provoqué par une réaction qui n'est certainement pas sans rapport avec la réaction d'incompatibilité entre hyphes C_1 et E_2. Mais il ne se produit pas, au cours de la fécondation, de réaction qui lèse d'une manière définitive aucune des structures du protopérithèce E_2 essentielles à la fécondation, puisque ces protopérithèces demeurent fécondables par des microconidies E_2. Il semble donc improbable que la réaction se produise dans l'ascogone ou même à l'intérieur du trichogyne, mais plus vraisemblablement à la surface de ce dernier, comme dans le cas envisagé par Esser.

En résumé, tout se passe, dans le cas du croisement $♀E_2 \times ♂C_1$, comme si l'incompatibilité sexuelle se manifestait dès le contact entre le trichogyne et la microconidie.

2° *Cas du croisement* $♀R_1 \times ♂R_2$.

Ce croisement présente trois particularités dont l'analyse s'est révélée intéressante :

1° Les résultats obtenus par confrontation directe des mycéliums ou par spermatisation des thalles sont différents. A 26°, dans le premier cas, la fertilité de part et d'autre du barrage est normale, ce qui paraît indiquer que le croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ est d'une fertilité normale comme le croisement réciproque. Au contraire, lorsque les croisements sont réalisés par spermatisation à la même température, la fertilité relative du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ est inférieure à 10 %, tandis que celle du croisement réciproque est, comme précédemment, normale.

2° La maturation des fructifications hybrides $♀R_1 \times ♂R_2$ est échelonnée et en moyenne plus tardive que celle des périthèces qui se forment au cours du croisement réciproque ou des croisements témoins $R_1 \times R_1$ ou $R_2 \times R_2$.

3° La fertilité relative du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ varie avec la température : pour des croisements réalisés par spermatisation, elle est de 15 % à 18° et voisine de 80 % à 32°.

Pour expliquer que le croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ soit plus fertile par confrontation que par spermatisation, une hypothèse simple consistait à supposer que le facteur limitant le degré de fertilité était le nombre des microconidies R_2 : en effet, la densité des microconidies formées dans la zone de barrage au contact de deux thalles est plus grande que celle des suspensions généralement utilisées pour effectuer les spermatisations.

Nous avons cherché à vérifier si le taux de fertilité d'un thalle R_1 variait en fonction de la densité des microconidies R_2.

a) L'hétérogénéité des microconidies R_2.

A partir des suspensions les plus riches, prélevées directement sur les thalles R_1 et R_2, nous avons effectué des dilutions successives donnant des concentrations relatives de 1/3, 1/9, 1/27, 1/81, et 1/243. Le tableau XV indique le nombre de périthèces obtenus pour la plus grande de ces dilutions (1/243) pour les croisements $R_1 \times R_1$, $♀R_1 \times ♂R_2$, $♀R_2 \times ♂R_1$ et $R_2 \times R_2$.

Tableau XV. — Fertilités comparées des croisements $R_1 \times R_1$, $R_2 \times R_2$ et $R_1 \times R_2$

	$♂R_1$	$♂R_2$
$♀R_1$	67	22
$♀R_2$	62	227

Ce tableau permet d'estimer le degré de fertilité du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ par rapport aux trois autres croisements à fertilité normale. Si la fertilité du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ était, elle, normale, on devrait obtenir, en rendant homogènes les résultats des quatre croisements (c'est-à-dire en déduisant l'influence des thalles femelles et des thalles mâles utilisés au cours de cette expérience), $227 \times \frac{67}{62}$, soit 245 périthèces hybrides $♀R_1 \times ♂R_2$. Comme les cultures R_1 ne comportent que 22 périthèces en moyenne, on peut évaluer la fertilité relative du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ à $\frac{22}{245} \times 100$, soit environ 9 %.

Le tableau XV permet aussi d'estimer le nombre des microconidies R_1 et R_2 contenues dans la suspension utilisée. Dans le cas de croisements à fertilité normale, le nombre des périthèces formés peut être considéré comme sensiblement équivalent au nombre des microconidies apportées, lorsque des cultures femelles portant des protopérithèces nombreux et uniformément répartis sont spermatisés par un nombre relativement restreint de microconidies. On peut donc estimer à 67 le nombre des microconidies R_1 et à 245 celui des microconidies R_2.

A partir de ces données, on peut faire une estimation du nombre des microconidies R_1 et R_2 apportées par la suspension initiale et par chacune des autres dilutions. On peut alors relier le nombre des périthèces R_1 fécondés à celui des microconidies R_1 et R_2. Les résultats sont représentés sur la figure 11.

Une première observation peut être dégagée : le parallélisme des deux droites de régression montre que la fertilité du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$ n'est limitée, comme pour les croisements $R_1 \times R_1$, que par le nombre des microconidies apportées. Cependant, il paraît nécessaire, pour obtenir le même nombre de périthèces, d'apporter environ dix fois plus de microconidies R_2 que de microconidies R_1.

On peut alors se demander si ce fait traduit une hétérogénéité des microconidies R_2 ou une hétérogénéité des protopérithèces R_1 ou des deux à la fois. Si la fertilité ne dépend que des microconidies, cela revient à admettre que 9 % seulement des microconidies R_2 sont

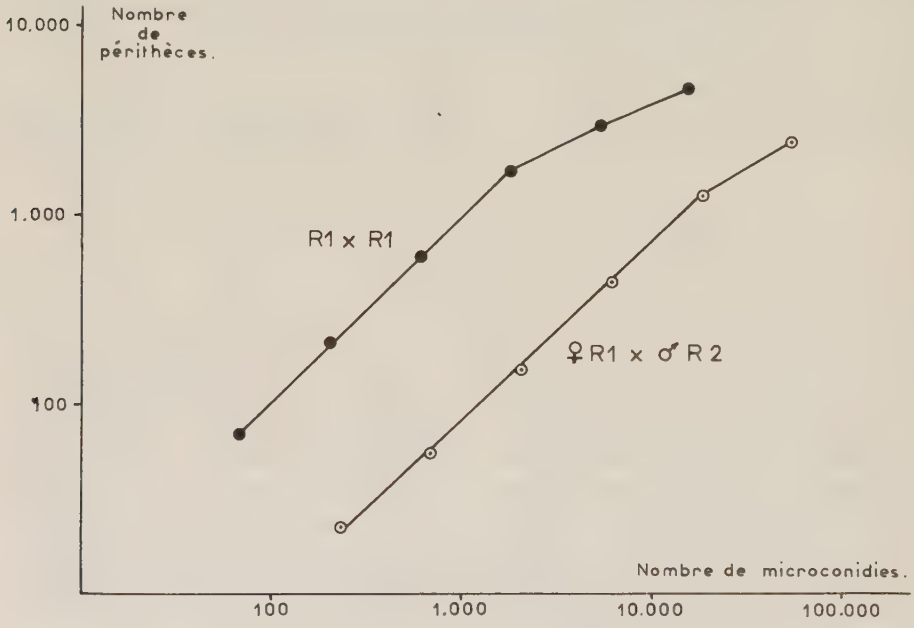


Fig. 11. — Relation entre le nombre de protopérithèces fécondés et le nombre de microconidies apportées dans les croisements $R_1 \times R_1$ et $♀R_1 \times ♂R_2$.

susceptibles de fertiliser les protopérithèces R_1. Dans la figure 12, la fertilité des cultures R_1 est exprimée en fonction du nombre des microconidies R_2 supposées « compatibles » (9 % des microconidies dans chaque dilution). On peut voir que la nouvelle courbe de régression se superpose à celle des croisements $R_1 \times R_1$. Tout indique donc que le succès ou l'échec d'une fécondation $♀R_1 \times ♂R_2$ ne dépend pas du protopérithèce R_1, mais uniquement de la microconidie R_2. Autrement dit, 10 % seulement des microconidies R_2 sont compatibles avec les protopérithèces R_1. Il y aurait donc deux types de microconidies, les unes compatibles, les autres incompatibles avec les protopérithèces R_1 dont les potentialités sont constantes.

On peut même montrer qu'un protopérithèce R_1 incompatible avec

une microconidie R_2 peut être fécondé par une autre microconidie R_2. Ce fait peut permettre d'expliquer la deuxième particularité du croisement $♀R_1 \times ♂R_2$, à savoir le caractère échelonné et plus tardif en moyenne de la maturation des périthèces. En effet, dans le cas des croisements $R_1 \times R_1$ nous constatons, dans une expérience, que 16 300 microconidies fertilisent 4 700 protopérithèces (chiffres correspondant à la concentration la plus forte en microconidies R_1), soit un taux effectif de fécondation de 0,28 par microconidie. Si la même proportion est conservée, 19 800 microconidies R_2 (titre de l'une de nos suspensions de microconidies) doivent fertiliser 19 800 × 0,28 soit

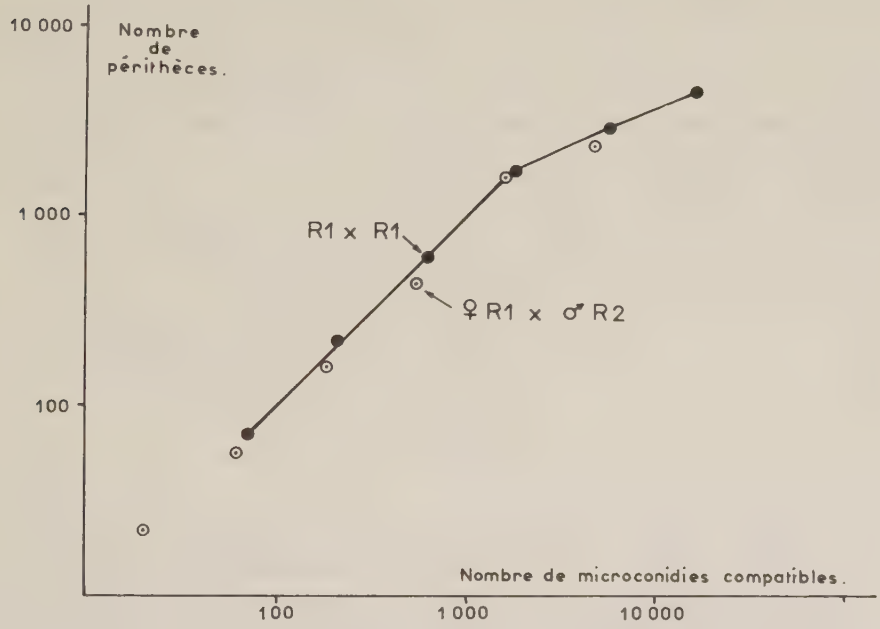


Fig. 12. — Relation entre le nombre de protopérithèces fécondés et le nombre de microconidies *compatibles* apportées dans le croisement $♀R_1 \times ♂R_2$.

5 870 protopérithèces; 9 % des fécondations étant réussies, on devrait trouver environ 500 périthèces hybrides $♀R_1 \times ♂R_2$. On en trouve en réalité 1 280. Les quelque 800 périthèces en excès sur le nombre prévu ne peuvent s'expliquer que par une fertilisation secondaire, par les microconidies R_2, en excès, de protopérithèces incompatibles avec une première microconidie : il y avait en effet au départ 19 800 × 0,09 soit 1 700 microconidies R_2 aptes à fertiliser les protopérithèces R_1. On peut alors admettre qu'un certain nombre de protopérithèces R_1 ne soient fécondés par des microconidies R_2 qu'après plusieurs essais infructueux par d'autres microconidies du même génotype, ce qui expliquerait l'échelonnement dans le degré de maturation des fructifications $♀R_1 \times ♂R_2$.

b) Influence des conditions externes sur la fertilité des croisements ♀R_1 × ♂R_2.

1° Facteurs influençant le phénotype des microconidies R_2. — L'analyse de l'effet de la température sur la fertilité du croisement ♀R_1 × ♂R_2 a permis de montrer que la réussite ou l'échec de chaque fécondation dépend bien du phénotype compatible ou incompatible de chaque microconidie R_2. Ce phénotype peut varier en fonction de divers facteurs au moment où se forment les microconidies, mais reste stable une fois établi.

La fertilité des croisements ♀R_1 × ♂R_2 dépend en effet de la température à laquelle sont formées les microconidies R_2. Le tableau XVI montre l'influence de ce facteur lorsque la température, au cours de la croissance des thalles femelles R_1 et au cours du développement des fructifications, est de 24°.

Tableau XVI. — Influence de la température au cours de la formation des microconidies R_2 sur la fertilité du croisement ♀R_1 × ♂R_2

	Température au cours de la formation des microconidies R_2			
	18°	24°	26°	29°
Fertilités du croisement ♀R_1 × ♂R_2	15 %	8 %	9 %	46 %

Les résultats du tableau XVI ne sont pas modifiés lorsqu'on laisse vieillir les microconidies R_2 pendant plusieurs jours dans un milieu nutritif liquide et lorsqu'on place les suspensions de microconidies à des températures variées. Ceci montre donc que les potentialités des microconidies R_2 sont définitivement déterminées lorsque nous les isolons des thalles.

Ces potentialités dépendent aussi de la richesse du milieu nutritif sur lequel sont cultivés les thalles R_2. Lorsqu'on double la quantité du milieu mis à la disposition d'une seule culture, la fertilité relative du croisement ♀R_1 × ♂R_2 est seulement de 3 % contre 8 % dans les conditions usuelles.

2° Influence de la température au cours du développement des fructifications ♀R_1 × ♂R_2. — On voit sur le tableau XVII que la fertilité des croisements ♀R_1 × ♂R_2 dépend aussi de la température au cours du développement du protopérithèce fertilisé : 9,3 % et 10,1 % à 26°, contre 19,6 et 19,4 % à 29°. On voit également que la fertilité est indépendante de la température au cours de la formation des proto-

TABLEAU XVII. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES PÉRITHÈCES SUR LA FERTILITÉ DES CROISEMENTS $♀R_1 \times ♂R_2$

		TEMPÉRATURE AU COURS DE LA FERTILISATION	
		26°	29°
TEMPÉRATURE AU COURS DE LA FORMATION DES PROTOPÉRITHÈCES.	26°	9,3 %	19,6 %
	29°	10,1 %	19,4 %

périthèces R_1 : 9,3 et 19,6 % à 26° ne sont pas significativement différents de 10,1 et 19,4 % à 29°. Mais, si les potentialités des microconidies sont stables et celles des protopérithèces constantes, il n'est pas simple d'expliquer cette variation de la fertilité en relation avec la température au cours de la fertilisation. Nous reviendrons plus loin sur ce phénomène, qui tend à montrer que le phénotype des microconidies R_2 ne suffit pas à expliquer la réussite ou l'échec des fécondations.

3° *Conclusions.*

Dans le cas des croisements $♀E_2 \times ♂C_1$ et $♀R_1 \times ♂R_2$, nous avons vu que la stérilité résultait des propriétés de la microconidie et que l'incompatibilité était déterminée par un arrêt du processus de la fertilisation dès le contact entre la microconidie et le trichogyne. La réaction d'incompatibilité qui se produit entre ces deux éléments sexuels aboutit à la mort ou au rejet de la microconidie sans altérer autrement la fécondabilité du protopérithèce. Cette réaction, dont le déterminisme génétique est le même que celui de l'incompatibilité cellulaire, résulte vraisemblablement aussi de l'interaction entre déterminants cytoplasmiques antagonistes. Nous savons qu'une réaction d'incompatibilité ne se produit entre éléments de génotype incompatible que si les deux facteurs cytoplasmiques sont présents en quantité suffisante.

Ceci nous permet de tirer quelques conclusions sur le déterminisme de l'incompatibilité sexuelle.

1° Puisque dans les croisements $♀R_1 \times ♂R_2$ et $♀E_2 \times ♂C_1$ la stérilité ne dépend que des propriétés des microconidies, cela signifie que les facteurs cytoplasmiques R_1 et E_2 sont présents en quantité suffisante dans les trichogynes correspondants.

2° Le fait que la stérilité ne dépende que des microconidies peut s'interpréter par la présence dans celles-ci des facteurs cytoplasmiques R_2 ou C_1. Toutes les microconidies C_1 contiendraient des facteurs C_1

en quantité élevée; les microconidies R_2 en contiendraient moins, ou la quantité présente serait déterminée de manière aléatoire, par une distribution passive dans le cytoplasme des microconidies, des facteurs existant dans les conidiophores.

3° Comme l'aptitude des microconidies à la fécondation ne varie pas après leur isolement, on peut admettre que de nouveaux facteurs cytoplasmiques ne sont pas synthétisés dans la microconidie. La distribution des phénotypes compatibles ou incompatibles parmi les microconidies d'une souche refléterait alors le niveau de la concentration

Tableau XVIII. — Expression phénotypique de quelques gènes d'incompatibilité au cours du cycle de développement.

Le signe + indique que le phénotype est exprimé, le nombre de croix traduisant le niveau relatif de concentration des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité. Le signe — correspond à la non-expression du phénotype. Les cases vides correspondent au cas où le phénotype ne peut être précisé.

Méiose → Asque			→ Mycéliums →			→ Organes sexuels	
Gènes	Délimitation des spores	Maturation des spores	Âgés de 3 h.	3 - 15 h.	"Adultes"	♀	♂
S	+	+	+	+	+	+	—
s	+	+	+	+	+	+	—
B1			+	+	+	+	—
B2			+	+	+	+	—
C1	+	+	+ + +	+ + +	+ +	+	+
D	—	+	+	+	+	+	—
E2	—		+	+	+	+	—
R2			+	+	+	+	+ —

des facteurs dans les filaments conidiophores. Cette interprétation est confirmée par le fait que, dans les cellules, la concentration des facteurs cytoplasmiques C_1 est toujours plus élevée que celle d'autres facteurs (cf. p. 670).

4° Cette interprétation permet de comprendre comment une élévation de température, lors de la fécondation, peut accroître la probabilité de fécondation d'une même population de microconidies. En effet, l'élévation de température accélère le processus de fécondation et pourrait donc permettre, dans un certain nombre de cas, la pénétration du noyau mâle dans le trichogyne et sa migration vers l'ascogone, avant que la réaction d'incompatibilité ait pu s'achever. Ce décalage entre les deux phénomènes doit être particulièrement efficace quand la réaction est lente, c'est-à-dire quand les facteurs cytoplasmiques apportés par la microconidie sont peu abondants, ce qui est vraisemblable pour un grand nombre de microconidies R_2.

5° On peut extrapoler cette interprétation et considérer que, lorsqu'un croisement impliquant deux gènes antagonistes est normalement fertile, ceci est dû à l'absence ou la très faible concentration

des facteurs cytoplasmiques dans les microconidies. Ce serait le cas des microconidies B_1, B_2, S, s, R_1, E_2 et D. La faible concentration des facteurs cytoplasmiques dans les microconidies refléterait leur concentration moyenne dans les hyphes. Effectivement, tous les gènes qui ne sont pas régulièrement exprimés au niveau de petits échantillons de cytoplasme (courts articles S, s, B_1, B_2, E_2 et D) sont également ceux dont l'expression phénotypique paraît absente dans les microconidies.

On peut alors compléter le tableau XIII par les indications qui viennent d'être acquises sur l'expression phénotypique des différents gènes dans les organes sexuels mâles et femelles. Tous les résultats se rapportant au rythme d'expression des gènes d'incompatibilité sont regroupés dans le tableau XVIII.

C. — LA STÉRILITÉ EST DUE AUX PROPRIÉTÉS DES PROTOPÉRITHÈCES. CAS DU CROISEMENT ♀D × ♂C_1

Alors que le croisement ♀C_1 × ♂D est toujours fertile, ce qui, d'après ce que nous venons de voir, peut s'interpréter par l'absence de facteur cytoplasmique D dans les microconidies correspondantes, le croisement ♀D × ♂C_1 est fertile ou stérile selon la température.

Si l'on exprime par le chiffre 100 la fertilité normale (déterminée à partir des croisements ♀D × ♂D), pour les températures de 20, 23, 26, 29 et 32°, la fertilité est respectivement de 0, 3, 14, 62 et 100.

Nous avons déjà vu que, dans les croisements ♀E_2 × ♂C_1, les microconidies possèdent toutes le facteur cytoplasmique C_1. En spermatisant les cultures D maintenues à température fixe par des microconidies C_1 formées à différentes températures, on constate que la fertilité du croisement ♀D × ♂C_1 ne varie pas. Si les propriétés des conidies C_1 ne sont pas modifiées par la température, les variations de la fertilité ne peuvent donc résulter que d'une action de la température, soit sur les propriétés des protopérithèces D, soit sur le développement des périthèces ♀D × ♂C_1.

1° Influence de la température au cours du développement des protopérithèces D.

a) Propriétés des protopérithèces formés à 20°.

Sur des thalles D, maintenus à 20° pendant toute leur croissance, des protopérithèces sont repérés individuellement. Ces thalles sont ensuite spermatisés par des microconidies C_1 et soit conservés à 20°, soit placés immédiatement après la spermatisation à 32°. Dans les deux cas aucun protopérithèce n'est fécondé.

b) Propriétés des protopérithèces formés à 32°.

Des protopérithèces sont repérés sur des thalles *D* placés à 32° et spermatisés par des microconidies C_1 ou *D* puis conservés, soit à 32° (série A), soit à 20° (série B), jusqu'au développement complet des périthèces. Les résultats de cette expérience sont groupés dans le tableau XIX.

Tableau XIX. — Influence de la température au cours de la formation des protopérithèces sur la fertilité du croisement $♀D \times ♂C_1$

	Protopérithèces *D* formés a 32° et fertilisés a	
	32° (série A)	20° (série B)
Microconidies *D* (croisements témoins).	152 / 1 981	117 / 2 063
Microconidies C_1.	121 / 1 760	25 / 1 892

Légende : Pour chaque rapport le chiffre inférieur représente le nombre des protopérithèces repérés et le chiffre supérieur le nombre de ceux qui ont été fertilisés.

On voit que la fertilité des croisements $♀D \times ♂C_1$, normale à 32°, n'est pas nulle mais seulement réduite à 20°.

c) Déterminisme des propriétés des protopérithèces.

Les protopérithèces formés à 20° et à 32° ont visiblement des propriétés différentes. Pour essayer de préciser quand et comment ces propriétés étaient acquises, nous avont fait l'expérience suivante :

Des thalles *D* sont cultivés à 20°, c'est-à-dire dans des conditions telles qu'aucun des protopérithèces formés n'est compatible avec une microconidie C_1. Ces thalles sont ensuite placés à 32° à un âge où la formation des protopérithèces est la plus intense (environ 1 000 protopérithèces nouveaux par 24 heures pour une seule culture en boîte de Pétri). Trois séries d'expériences ont été réalisées, correspondant respectivement à des temps de séjour à 32° de 8, 16 et 24 heures. Ces cultures ont ensuite été définitivement ramenées à 20° et fécondées à cette température par des microconidies C_1.

A l'intérieur de chaque série, les fertilités des cultures sont faiblement dispersées : après un temps de passage de 8, 16 et 24 heures, la

fertilité moyenne par boîte de culture est respectivement de 96, 203 et 293 périthèces.

La fertilité des cultures *D* est donc proportionnelle à la durée d'exposition à 32° ou, plus précisément, au nombre des protopérithèces qui se sont formés à cette température. La linéarité de la régression entre la fertilité des cultures et le temps de passage à 32° montre qu'un temps très bref à cette température suffit pour que le protopérithèce qui se forme soit d'un type nouveau. Ce temps est très inférieur à la durée du développement complet d'un protopérithèce.

d) Stabilité des propriétés des protopérithèces.

On sait déjà que les propriétés des protopérithèces *D* formés à 20° sont stables : dans aucune expérience nous n'avons, en effet, réussi à les féconder par des microconidies C_1 et, ceci, indépendamment de leur âge et des conditions de température.

On peut se demander si les propriétés des protopérithèces se formant à 32° ont la même stabilité. Deux expériences nous renseignent sur ce point.

a) Sur des cultures *D*, des protopérithèces formés à 32° sont individuellement repérés, puis les cultures sont placées à 20° pendant quatre jours avant d'être spermatisées à cette température. Les résultats sont indiqués sur le tableau XX. On peut comparer ces résultats à

Tableau XX. — Effet du vieillissement des protopérithèces *D* sur leur aptitude a être fécondés par les microconidies C_1

	Protopérithèces *D* formés a 32° et fertilisés a 20°	
	1° Immédiatement après leur formation	2° Quatre jours plus tard
Microconidies *D*.	117 / 2 063	62 / 2 132
Microconidies C_1.	25 / 1 892	10 / 2 226

Légende : Comme pour le tableau XIX.

ceux du tableau XIX qui correspondent à des fécondations réalisées à 20°, mais immédiatement après le repérage des protopérithèces (série B).

On voit que la fertilité des cultures *D* décroît avec l'âge des proto-

périthèces; mais ceci est vrai également pour le croisement témoin *(D × D)* et très caractéristique de l'organisme. Cependant la fertilité relative du croisement ♀$D \times \delta C_1$ reste inchangée.

Cette stabilité des propriétés des protopérithèces *D* formés à 32° peut être confirmée et précisée par un autre type d'expérience.

b) Des cultures *D* sont maintenues à 19° jusqu'à l'apparition régulière des protopérithèces; on sait qu'aucun des protopérithèces formés à cette température ne peut être fécondé par les microconidies C_1. Ces thalles sont ensuite placés pendant 28 heures à 32°; pendant ce temps se forment des protopérithèces compatibles. Dans une première série, les cultures sont immédiatement fertilisées, soit à 23°, soit à 19°, soit à 16°; dans une deuxième série, les cultures sont ramenées pendant 4 jours à 19° avant d'être spermatisées aux mêmes températures que précédemment. Les résultats sont consignés dans le tableau XXI.

Tableau XXI. — Stabilité des propriétés des protopérithèces *D* (explications dans le texte).

Protopérithèces *D* fertilisés par des microconidies C_1	Températures au cours de la fertilisation			Total
	16°	19°	23°	
1° Peu de temps après leur formation ...	97	213	741	1 051
2° Quatre jours plus tard	67	129	431	627

Nous retrouvons ici la diminution de la fertilité due au vieillissement des protopérithèces, qui est la même pour les croisements témoins $D \times D$ réalisés plus haut. Mais on constate que la distribution des fertilités en relation avec la température au cours de la fécondation reste inchangée (χ^2 d'homogénéité de 2,93 pour deux degrés de liberté). Ceci montre que les protopérithèces *D* conservent intégralement, après 4 jours à 19°, le bénéfice du traitement à 32°.

e) Conclusions.

L'aptitude à la fécondation des protopérithèces *D* dépend de la température au cours de leur formation. Cette propriété, acquise au cours du développement du protopérithèce en un très court intervalle de temps, se conserve avec une stabilité remarquable.

2° Influence de la température au cours du développement des périthèces.

Nous avons vu que les protopérithèces formés à 32° sont tous fécondables à 32°, mais qu'une partie seulement le reste à 20°.

La température à laquelle se développent les périthèces une fois fertilisés peut donc avoir une influence, indépendamment des potentialités propres des protopérithèces. Nous avons cherché à préciser ce point dans l'expérience suivante.

a) Résultats.

Des thalles *D* sont maintenus pendant toute leur croissance, soit à 26°, soit à 32°, puis spermatisés et conservés à différentes températures. Les taux de fertilité, par rapport à des croisements témoins $D \times D$ réalisés dans les mêmes conditions de température, sont indiqués dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES PÉRITHÈCES SUR LA FERTILITÉ DES CROISEMENTS $♀D \times ♂C_1$

		TEMPÉRATURES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DES PÉRITHÈCES					
		16°	20°	24°	26°	28°	32°
PROTOPÉRITHÈCES *D* FORMÉS A	26°	0,6	5,3	11,7	19	43,2	100
	32°	4,2	21,7	—	43,2	—	100

On voit, d'une part, que la fertilité croît dans les deux cas avec la température au cours du développement des périthèces et, d'autre part, que, pour chacune de ces températures, les fertilités sont plus élevées pour les protopérithèces formés à 32° que pour ceux formés à 26°.

b) Discussion.

Des deux stades auxquels la température peut influencer la fertilité des croisements $♀D \times ♂C_1$, il apparaît que le premier (moment de la formation du protopérithèce) est primordial et que l'on peut, à cet égard, classer les protopérithèces *D* en deux types. Le type I correspond aux protopérithèces formés à 20° et qui demeurent infécon-

dables à toute température. Le type II correspond aux protopérithèces formés à une température supérieure ou égale à 26°; ils sont tous fécondables à 32°, mais une partie d'entre eux seulement le demeure à plus basse température : d'après les résultats précédents, 5 % des protopérithèces formés à 26° sont fécondables à 20°, mais 20 % environ des protopérithèces formés à 32° sont fécondables à 20°.

Les protopérithèces de type II posent alors un problème. Ont-ils tous les mêmes potentialités et le nombre de ceux qui restent fécondables à 20° dépend-il d'un événement aléatoire de probabilité donnée et constante ou, au contraire, forment-ils une population hétérogène dans laquelle certains seraient fécondables à toute température et d'autres seulement à température élevée ? Sans que l'on puisse préciser la nature de cette hétérogénéité, il semble bien que la deuxième hypothèse soit la bonne, car la proportion des protopérithèces fécondables à chaque température s'accroît avec la température où ils se forment.

Quoi qu'il en soit, il existe une apparente contradiction entre le fait établi plus haut que les potentialités des protopérithèces sont acquises au cours de leur formation et stables ensuite, et le fait que la température après la spermatisation modifie le taux de fécondité. Pour résoudre cette question, nous avons cherché à préciser le processus d'incompatibilité au cours des phénomènes sexuels.

3° Analyse de l'incompatibilité sexuelle.

a) Moments des réactions d'incompatibilité.

L'expérience suivante montre que l'incompatibilité, au cours du développement du protopérithèce fertilisé, se produit plus tardivement pour les protopérithèces de type II que de type I.

Nous avons fertilisé à 20° des thalles *D* appartenant à deux séries : les uns (première série) avaient poussé à 20° et possédaient des protopérithèces de type I; les autres (deuxième série) avaient poussé à 28° et possédaient des protopérithèces de type II.

Après la spermatisation, tous les protopérithèces qui captent une microconidie grossissent au moins jusqu'à un diamètre de 50 μ (cf. p. 707); puis, selon les cas, cette évolution est stoppée plus ou moins vite, ou se poursuit normalement si la fécondation réussit. Après apport de microconidies C_1, nous avons mesuré le diamètre de nombreux protopérithèces ayant atteint ou dépassé 50 μ et groupé ces mesures en trois classes : 50-70 μ, 70-110 μ, et 110-180 μ. Les résultats sont représentés sur la figure 13.

Les protopérithèces de type II restant incompatibles se répartissent en ces trois catégories, tandis que les protopérithèces de type I se rangent essentiellement dans la catégorie de plus faible taille (cf. Pl. II, fig. *E* et *F*).

Si l'arrêt du grossissement des protopérithèces après l'apport des microconidies C_1 résulte bien de l'arrêt du processus sexuel, on peut admettre que la réaction d'incompatibilité se produit plus tardivement pour les protopérithèces de type II que de type I.

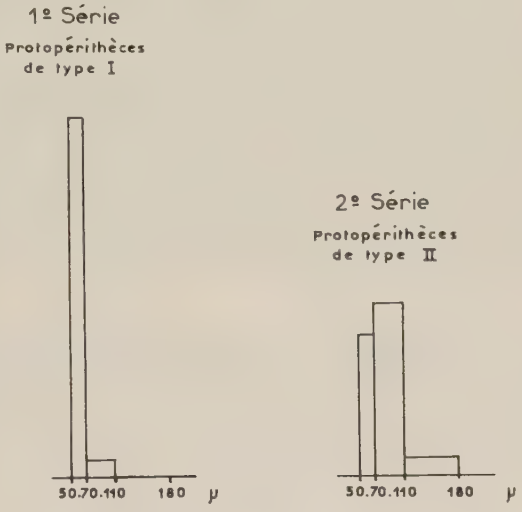


FIG. 13.

Distribution des diamètres des protopérithèces *D* au terme de leur évolution après une fertilisation par des microconidies C_1 (explications dans le texte).

b) Effets de la réaction d'incompatibilité sur les protopérithèces.

1° Résultats. — Afin de déterminer si l'effet d'une fécondation avortée est le même pour les protopérithèces de types I et II, nous avons traité des thalles *D* portant soit des protopérithèces I, soit des protopérithèces II, de la manière suivante.

TABLEAU XXIII. — MISE EN ÉVIDENCE DE L'EFFET DE LA RÉACTION D'INCOMPATIBILITÉ SUR LES PROTOPÉRITHÈCES *D* (explications dans le texte).

NATURE DES PROTOPÉRITHÈCES *D*		NATURE DES MICROCONIDIES : 1° Spermatisation ↓	NATURE DES MICROCONIDIES : 2° Spermatisation ↓	NOMBRE DE PÉRITHÈCES
Type I.	1re série.	..... C_1	..... *D*	3 245
	2e série.	.....	..... *D*	3 062
	3e série.	.....	..... C_1	0
Type II.	1re série.	..... C_1	..... *D*	930
	2e série.	.....	..... *D*	6 342
	3e série.	.....	..... C_1	551

Une première série de thalles *D* (protopérithèces I et II) est spermatisée deux fois : par des microconidies C_1, puis, 24 heures plus tard, par des microconidies *D*. A ce moment, une deuxième série est spermatisée uniquement par des microconidies *D* et une troisième série uniquement par des microconidies C_1. Pour chacune des séries, le nombre final des périthèces formés est évalué. Les résultats sont indiqués sur le tableau XXIII (voir p. 721).

On voit qu'une première spermatisation par des microconidies C_1 ne modifie pas la fertilité ultérieure des protopérithèces de type I (3 245 périthèces formés dans la première série, contre 3 062 dans la série témoin $D \times D$). Au contraire, dans le cas des protopérithèces de type II, une première spermatisation par des microconidies C_1 diminue la fertilité ultérieure des croisements par des microconidies *D* (930 périthèces contre 6 342).

2° ***Discussion.*** — La réaction d'incompatibilité paraît sans effet sur les protopérithèces de type I et se produit dès le contact entre le trichogyne *D* et la microconidie C_1, comme dans le cas du croisement $♀E_2 \times ♂C_1$. Au contraire, dans le cas des protopérithèces de type II, la réaction se produit plus tard et altère des structures du protopérithèce nécessaires à la fécondation.

Le caractère précoce ou tardif des réactions, attribut du protopérithèce *D* acquis au cours de sa formation et stable ensuite, est donc indépendant de la température au cours de la fertilisation. On retrouve ici le fait que le caractère précoce ou tardif des réactions entre éléments végétatifs C_1 et *D* (hyphes par exemple) ne dépend que de la température au cours de la croissance de l'élément *D*, c'est-à-dire de la température à laquelle les facteurs D ont été synthétisés.

Il est alors vraisemblable que la réussite ou l'échec des fécondations pour des protopérithèces de type II qui, nous l'avons vu, dépendent aussi de la température pendant le développement du périthèce, résultent en définitive du rapport entre la vitesse relative de la réaction d'incompatibilité (qui est fixe) et la vitesse de développement du périthèce. Cette vitesse est en effet variable avec la température : dans les périthèces évoluant à 32°, les asques sont mûrs 3 jours après la spermatisation et, dans ceux évoluant à 18°, 7 jours seulement après la spermatisation.

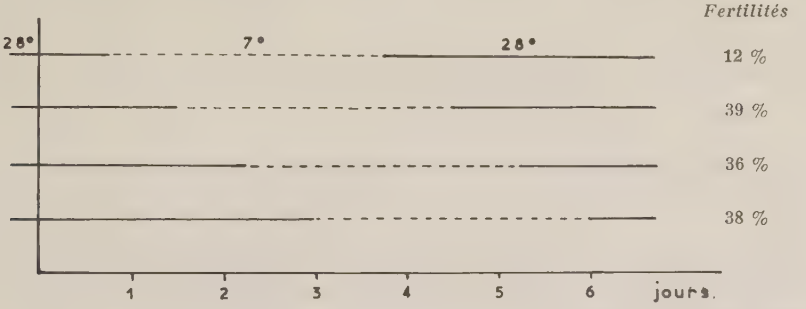
Si cette interprétation est juste, on doit s'attendre à ce qu'un ralentissement du développement du périthèce par abaissement de la température ne diminue la fertilité que s'il se produit tôt après la spermatisation; dans ce cas, en effet, la réaction d'incompatibilité a le temps de « rattraper » le noyau mâle avant qu'il soit parvenu dans l'ascogone ou avant qu'il s'y soit multiplié.

c) Analyse de l'effet de la température au cours de la fertilisation.

Dans une première expérience (cf. tableau XXIV), nous avons fertilisé à 28° des protopérithèces formés à cette température (type II), soit par des microconidies C_1, soit par des microconidies D. Les cultures ont été ensuite placées à 7° pour stopper le développement des périthèces. Le passage à 7°, effectué 18, 36, 54 ou 72 heures après la spermatisation, a duré 3 jours, après lesquels les cultures ont été ramenées à la température initiale, pour que les périthèces terminent leur maturation. La fertilité relative des différentes cultures est rapportée à celle des croisements $D \times D$ subissant le même mode de traitement. En l'absence de ce traitement, la fertilité relative du croisement $♀D \times ♂C_1$ à 28° est de 35 à 40 %.

TABLEAU XXIV. — INFLUENCE D'UN ARRÊT A DIVERS STADES DU DÉVELOPPEMENT DES PÉRITHÈCES SUR LA FERTILITÉ RELATIVE DU CROISEMENT $♀D \times ♂C_1$.

—— temps de croissance à 28°.
--- temps de maintien à 7°.



Le tableau XXIV montre que la fertilité relative du croisement $♀D \times ♂C_1$ n'est réduite que si l'on arrête l'évolution des protopérithèces au cours des premiers stades de leur développement.

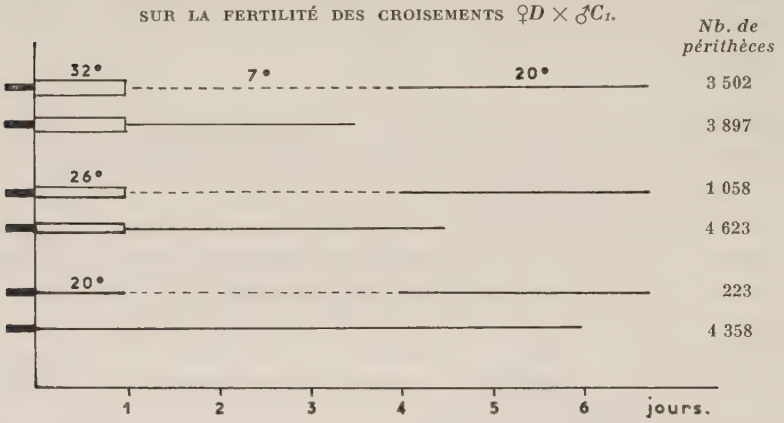
Il semble donc, conformément à notre attente, que, passé un stade critique moins de 24 heures après la spermatisation, l'abaissement de la température ne puisse plus modifier la fertilité des protopérithèces de type II.

Si l'avortement de la fécondation est bien dû à la mort du noyau mâle, provoquée par la réaction d'incompatibilité, le résultat précédent signifie que, passé le stade critique, le noyau mâle est « sauvé » et ne peut plus être atteint par la réaction d'incompatibilité. Une hypothèse simple consiste alors à supposer que le noyau mâle est sauvé lorsqu'il est parvenu dans l'ascogone. Il est en effet extrêmement probable que le noyau mâle, dans sa migration, n'est pas accompagné de cytoplasme et en particulier de facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité. On peut alors prévoir que plus cette migration sera rapide (et on peut l'accélérer en élevant la température), moins le blocage du développement

du périthèce provoqué pendant la phase critique sera susceptible de diminuer la fécondité. Il en est bien ainsi comme le montre l'expérience suivante.

Trois séries de thalles *D*, cultivés à 28°, sont placées, dès la spermatisation, respectivement à 20, 26 et 32° pendant 24 heures. Toutes sont alors transférées 3 jours à 7°, puis ramenées à 20° pour que les périthèces achèvent leur maturation. Les résultats sont représentés sur le tableau XXV, où sont également figurés les résultats de cultures témoins n'ayant pas subi de passage à 7°.

Tableau XXV. — Influence de la température au début du développement des périthèces sur la fertilité des croisements ♀*D* × ♂*C*1.



On voit que le traitement à 7° modifie peu la fertilité des cultures fécondées à 32° et a un effet d'autant plus important que la température initiale est plus basse.

En résumé, ces deux expériences montrent que l'influence de la température au cours du développement des périthèces s'exerce seulement pendant une phase critique, tôt après la spermatisation, et que cette phase critique est d'autant plus brève qu'elle s'accomplit à une température plus élevée. D'autre part, le fait que le noyau mâle échappe définitivement à la réaction d'incompatibilité moins de 24 heures après la spermatisation à 32° indique que la réaction d'incompatibilité n'affecte pas l'ascogone; cette réaction serait limitée au trichogyne.

4° *Conclusions.*

1° L'incompatibilité sexuelle au cours des croisements ♀*D* × ♂C_1 peut s'accomplir de deux manières :

— soit par une réaction immédiate dès le contact entre la microconidie C_1 et le trichogyne du protopérithèce *D*. Les protopérithèces

qui réagissent de cette manière sont infécondables à toutes températures;

— soit par une réaction se développant avec retard au cours de l'évolution du protopérithèce fertilisé et très vraisemblablement dans le trichogyne. Les protopérithèces qui réagissent ainsi sont toujours fécondables à 32° et peuvent l'être à basse température.

2° Le caractère immédiat ou retardé de la réaction d'incompatibilité est un attribut exclusif du protopérithèce *D*, qui est déterminé de manière définitive, en un très court intervalle de temps, au cours de son développement.

3° La réussite ou l'échec d'une fécondation $♀D \times ♂C_1$ dépend de la vitesse relative du développement du périthèce d'une part, et de la réaction d'incompatibilité d'autre part. Lorsque la réaction est immédiate (cas des protopérithèces formés à 20°) l'incompatibilité sexuelle est certaine. La fécondation ne devient possible que dans le cas où la réaction se produit avec retard (protopérithèces *D* formés à plus de 26°) et lorsque l'évolution du protopérithèce fertilisé est accélérée par une élévation de la température au cours de la fertilisation.

D. — CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Dans le cas où les différences génétiques entre deux souches ne font intervenir qu'un seul système élémentaire d'incompatibilité, la fertilité ou stérilité de leur croisement dépend de l'absence et de la présence d'une réaction d'incompatibilité entre éléments sexuels mâles et femelles, analogue à celle que l'on observe entre éléments végétatifs.

Les gènes d'incompatibilité étant toujours exprimés dans les protopérithèces, la réussite d'une fécondation dépend en premier lieu du phénotype de la microconidie. Certains gènes, comme C_1, sont toujours phénotypiquement exprimés dans les microconidies. D'autres gènes, comme B_1, B_2, D, E_2, R_1 et S, ne le sont jamais ou, du moins, si faiblement que la réaction d'incompatibilité ne se produit pas. Le gène R_2 offre une situation intermédiaire : 10 % des microconidies R_2 n'expriment pas le phénotype [R_2]. On peut penser que ceci est lié à une raréfaction des facteurs cytoplasmiques R_2 dans les filaments conidiophores, conduisant, avec une certaine probabilité, à des microconidies qui en sont pratiquement dépourvues. Dans le cas du gène *s*, grâce à la germination autonome de rares microconidies, on a pu directement étudier leur phénotype et l'on a constaté que certaines sont effectivement dépourvues du facteur cytoplasmique s (Beisson-Schecroun, 1962).

Un deuxième facteur peut être décisif pour la réussite ou l'échec d'une fécondation. Même si les deux gènes antagonistes sont respectivement exprimés dans les microconidies et les protopérithèces, la fécondation peut se dérouler normalement lorsque la réaction d'incom-

patibilité se produit tardivement, alors que le noyau mâle est déjà parvenu dans l'ascogone. Nous avons vu en effet, dans le cas du croisement $♀D \times ♂C_1$, que la réussite de la fécondation ne dépend que du gène D ou plus précisément des conditions de température au cours desquelles s'individualisent les organes femelles D : les protopérithèces D formés à 32° conduisent en effet à des réactions retardées; ceux qui se forment à 20° déterminent, au cours du même type de croisement, des réactions à effet immédiat, identiques à celles que l'on rencontre au cours des croisements $♀E_2 \times ♂C_1$ ou $♀R_1 \times ♂R_2$.

Le parallélisme entre cet effet de la température sur la fertilité du croisement $♀D \times ♂C_1$ d'une part, et sur la réaction d'incompatibilité entre hyphes C_1 et D (réaction immédiate et localisée à 20°, réaction différée et diffuse à 32°) d'autre part, constitue une excellente confirmation du fait que l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle résultent du même mécanisme d'interaction entre facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité.

En résumé, dans le cas où la réaction entre le trichogyne et la microconidie est immédiate, la fécondation ne réussit que si le gène d'incompatibilité d'origine mâle n'est pas exprimé dans la microconidie. Le degré de fertilité dans ce type d'interaction correspond alors à la proportion de microconidies où le gène d'incompatibilité n'est pas exprimé : moins de 0,001 % dans le cas du gène C_1, 10 % dans le cas du gène R_2, près de 100 % dans le cas des gènes E_2, D, B_1, B_2 et E_1. Cependant, même si les gènes de barrage sont exprimés dans les microconidies, la fécondation demeure possible si la réaction d'incompatibilité se produit tardivement. C'est ainsi qu'une élévation de la température au moment de la fertilisation, qui accélère relativement plus le déroulement des processus sexuels que celui de la réaction d'incompatibilité, a toujours pour effet d'augmenter la fertilité.

CHAPITRE IV

CONCLUSION DE LA TROISIÈME PARTIE

L'étude de l'interaction entre gènes d'incompatibilité à tous les stades du cycle de développement de l'organisme nous a conduit aux conclusions suivantes.

1° L'incompatibilité cellulaire est provoquée par l'affrontement des déterminants cytoplasmiques associés à l'activité des deux gènes responsables d'un système d'incompatibilité.

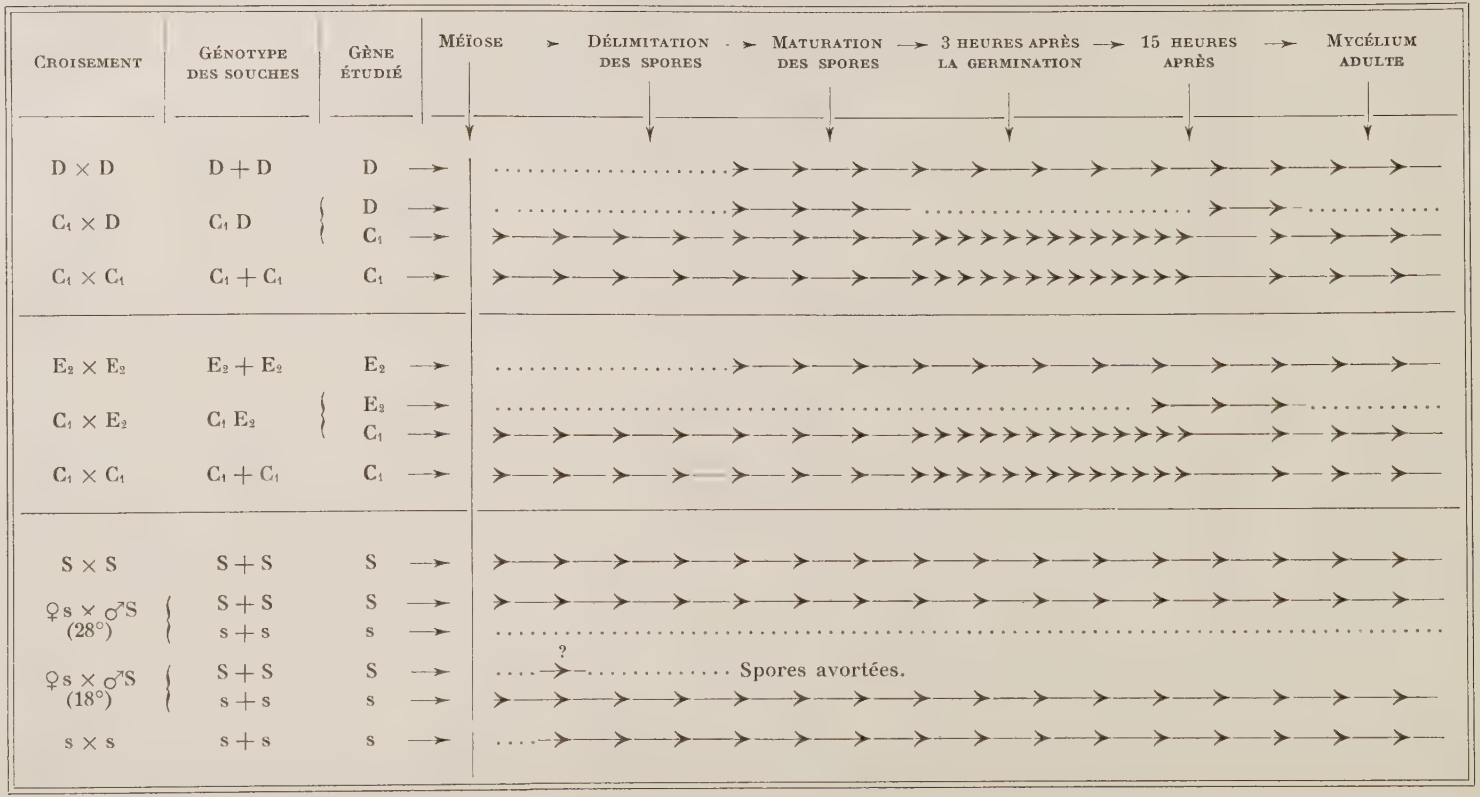
L'évolution des réactions d'incompatibilité dépend en premier lieu de la concentration de ces déterminants : lorsque la concentration de l'un d'eux est déficiente, la réaction est affaiblie et très souvent retardée. Le caractère immédiat ou différé des réactions d'incompatibilité dépend aussi des propriétés particulières des déterminants cytoplasmiques : ainsi lorsque le déterminant associé au gène *D* est synthétisé à 32°, la réaction se produit seulement 24 ou 48 heures après la rencontre des facteurs C_1 et D; au contraire, lorsque les facteurs D sont formés à 20°, la réaction suit immédiatement l'affrontement des facteurs, comme c'est le cas pour tous les autres types d'interaction étudiés.

2° L'interaction entre deux déterminants cytoplasmiques antagonistes est responsable de toutes les manifestations connues de l'incompatibilité. Entre deux hyphes, la rencontre des déterminants conduit généralement à la mort de cellules. Dans une même spore ou dans des cellules d'une souche F_1, la rencontre des facteurs synthétisés par deux gènes antagonistes, réunis dans un même noyau ou dans un même cytoplasme, détermine les anomalies observées dans le développement de certaines spores et l'auto-incompatibilité des souches. Enfin, l'affrontement des déterminants cytoplasmiques antagonistes contenus dans le trichogyne du protopérithèce et dans la microconidie est responsable de la réaction d'incompatibilité qui entraîne la stérilité des croisements; cette réaction peut se produire, soit dès le contact entre ces deux éléments sexuels, soit plus tard au cours de la migration du noyau mâle dans le trichogyne.

3° En suivant l'expression phénotypique des différents gènes d'incompatibilité tout au long du cycle de l'organisme, on constate que, pour chacun de ces gènes, l'expression phénotypique n'est présente que pendant une période définie du cycle : elle apparaît à un moment

TABLEAU XXVI. — EFFETS DE L'INTERACTION ENTRE GÈNES ANTAGONISTES SUR LEUR EXPRESSION PHÉNOTYPIQUE

(Le pointillé traduit la non-expression d'un gène; les flèches indiquent que le gène est exprimé et leur densité représente la concentration des facteurs cytoplasmiques présents.)



précis (variable avec les gènes) après la méiose et se maintient à un niveau constant ou variable et, dans le second cas, le changement s'opère aussi à un stade précis du développement. Enfin, elle est, selon les gènes, présente ou absente dans les microconidies (voir tableau XVIII, p. 714).

4° Ces propriétés de l'expression phénotypique des différents gènes peuvent se trouver modifiées lorsque deux gènes antagonistes se trouvent réunis au cours d'un croisement. Cette modification s'opère au cours du développement de l'asque jusqu'à la maturation des spores incluse. Elle se traduit toujours par la suppression de l'expression du gène qui, indépendamment de toute interaction, est plus tardivement exprimé; l'expression du gène « dominant » n'est pas modifiée (voir tableau XXVI).

5° Le sort du gène inhibé dépend de ses propriétés particulières : la suppression de l'expression phénotypique peut être stable mais constamment réversible à tous les âges (cas du gène *s*); l'inhibition, d'abord provisoire, de l'expression peut être suivie d'une inhibition irréversible, présentant le caractère d'une mutation vers un état amorphe (cas des gènes *D* et E_2); l'inhibition peut être incompatible avec la survie des noyaux (cas du gène *S*).

6° Il n'existe, en fait, qu'une seule phase du cycle où la réunion des deux gènes d'incompatibilité ne se traduise par aucun type d'interaction : cette phase s'étend de la pénétration du noyau mâle dans le protopérithèce jusqu'à l'individualisation des asques et peut-être même la méiose. Ceci tient vraisemblablement au fait que le noyau mâle n'apporte pas de cytoplasme dans l'ascogone et que les noyaux mâles et femelles n'ont pas d'activité hétérocatalytique au cours du phénomène sexuel proprement dit.

QUATRIÈME PARTIE

DISCUSSION

Lorsque nous avons entrepris cette étude de l'incompatibilité entre souches sauvages de *Podospora anserina*, nous nous proposions essentiellement d'établir les relations entre les manifestations variées d'incompatibilité observées entre ces souches : incompatibilité cellulaire, stérilité des croisements et anomalies dans le développement des spores et des souches F_1.

L'analyse génétique nous a montré que ces diverses manifestations dépendent toutes du même déterminisme génétique : nous avons reconnu en effet l'existence de plusieurs mécanismes élémentaires d'incompatibilité, correspondant tous à l'interaction spécifique de deux gènes, allèles ou non allèles. Chacune de ces interactions offre un spectre défini de conséquences, allant du seul barrage (cas de l'interaction B_1B_2 par exemple) à toute une série d'anomalies : barrage, semi-incompatibilité, anomalies dans le développement des spores et descendants létaux (cas de l'interaction C_1D).

Nous avons montré que toutes ces manifestations ont la même base physiologique : elles résultent de l'interaction entre des facteurs cytoplasmiques associés aux deux gènes d'un système élémentaire d'incompatibilité. Cette interaction a des conséquences différentes selon le stade où elle se produit au cours du cycle de l'organisme. L'un des problèmes les plus intéressants soulevés à ce sujet est d'expliquer 1° comment la même interaction entre facteurs cytoplasmiques conduit à des résultats aussi variés que la mort des cellules au cours de l'anastomose de deux hyphes, l'incompatibilité sexuelle, la réduction de la taille des spores et les anomalies de la croissance des descendants et 2° de comprendre pourquoi, dans certains cas, cette interaction, bien que potentiellement contenue dans la réunion des deux gènes antagonistes, ne se traduit par aucune manifestation visible.

L'étude de ces problèmes nous a conduit à conclure que la diversité des résultats d'une même situation génétique — coexistence, dans un cytoplasme commun, de deux gènes incompatibles — dépendait des particularités de chaque gène. Chacun d'eux possède en effet un rythme de fonctionnement, un moment d'expression et une réponse à l'effet inhibiteur du gène antagoniste qui lui sont propres.

Si ces conclusions sont justifiées, de tels résultats méritent d'être envisagés dans le cadre de problèmes plus généraux. Le déterminisme de l'expression et de l'inhibition des gènes constitue l'un de ces problèmes. L'examen de celui-ci doit nous permettre de mieux comprendre les rapports variés entre les diverses modalités d'une même incompatibilité et, en particulier, les relations entre l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle. Par ailleurs, la connaissance précise du mode d'action des gènes d'incompatibilité permet d'envisager, dans de bonnes conditions, le rôle de ces gènes dans le processus de différenciation de l'espèce.

Nous envisagerons donc successivement :

1° *Mode d'expression des gènes de barrage.*

2° *Relation entre l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle.*

3° *Rôle de l'incompatibilité dans le processus de spéciation.*

CHAPITRE PREMIER

MODE D'EXPRESSION DES GÈNES DE BARRAGE

Nous avons vu que l'action des gènes d'incompatibilité est matérialisée par des facteurs cytoplasmiques dont la rencontre suffit à provoquer la mort de cellules, même si ces cellules ne contiennent pas les gènes responsables (cf. troisième partie, chapitre I). Bien que les réactions d'incompatibilité puissent se produire indépendamment de la proximité immédiate des noyaux, le maintien de ces facteurs est toujours dépendant de la présence des gènes correspondants. Pour ces deux raisons, nous avons admis que ces divers facteurs constituaient les produits respectifs de l'activité des divers gènes d'incompatibilité. Si cette interprétation est justifiée, il est légitime de penser que la présence ou l'absence des facteurs cytoplasmiques traduit l'activité ou l'inactivité des gènes correspondants. Nous essaierons tout d'abord de préciser : 1° dans quelle mesure ce que l'on peut savoir de la nature de ces facteurs permet effectivement de les considérer comme des produits assez directs de l'activité des gènes et 2° dans quelle mesure les tests phénotypiques sur lesquels sont basées nos conclusions renseignent effectivement sur la présence ou l'absence de ces facteurs.

A. — NATURE DES FACTEURS CYTOPLASMIQUES D'INCOMPATIBILITÉ

Les deux facteurs cytoplasmiques présentent, dans la réaction d'incompatibilité, une spécificité stricte vis-à-vis du facteur antagoniste. A chaque allèle d'un même locus correspond un facteur antagoniste de spécificité distincte. C'est évidemment le cas lorsque l'incompatibilité s'exerce entre gènes allèles (cas des interactions B_1B_2, Ss, Z_1Z_2 et R_1R_2). C'est aussi le cas lorsque l'incompatibilité est déterminée par des gènes non allèles. Nous avons reconnu quatre allèles au locus C, et trois allèles au locus E : l'incompatibilité résulte d'une interaction entre un allèle précis de C et un allèle précis de E. Il y a donc une correspondance certaine entre la spécificité de chaque allèle et la

spécificité de la réaction du facteur cytoplasmique correspondant avec un facteur antagoniste. Cette correspondance est aussi précise que celle qui existe entre un gène et une protéine dont il contrôle la structure. Bien que nous n'ayons aucune preuve directe de la nature protéique des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité, cette hypothèse paraît vraisemblable. En effet, l'étude, chez *Neurospora crassa*, d'un système d'incompatibilité en tout point analogue aux nôtres, a montré que les éléments du cytoplasme responsable de la réaction d'incompatibilité étaient des protéines (Wilson, Garnjobst et Tatum, 1958); chez le *Podospora anserina*, on a constaté l'effet inhibiteur du chloramphénicol et de la ribonucléase sur la synthèse du facteur cytoplasmique S (Beisson-Schecroun, 1962).

D'autre part, les propriétés des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité sont stables et généralement homogènes. Ce que nous appellerons leur spécificité, c'est-à-dire la spécificité de leur interaction avec le facteur antagoniste, est indépendante des conditions de milieu et du reste du génotype. Ces facteurs migrent, se maintiennent et conservent toutes leurs propriétés dans un protoplasme où ils ne sont pas synthétisés. On provoque en effet, par simple échange de cytoplasme, des réactions d'incompatibilité en tout point identiques à celles qui résulteraient de la réunion des gènes responsables dans une même cellule. Dans une des situations décrites, deux types de facteurs cytoplasmiques également stables paraissent liés à l'activité d'un même gène, le gène *D*. Selon la température, l'un ou l'autre de ces facteurs est présent. Ce fait n'est pas incompatible avec l'hypothèse que ces facteurs sont des protéines : on peut imaginer, en effet, deux états de configuration d'une même molécule présentant à la fois des propriétés communes et des propriétés différentes. Le caractère commun à tous les facteurs D est que leur interaction avec le facteur C_1 se traduit toujours par une réaction d'incompatibilité; les propriétés différentes concernent le délai de cette réaction. On connaît des exemples de protéines ou d'enzymes subissant des modifications stables de leur structure, responsables du changement d'un certain nombre de leurs propriétés : c'est le cas notamment de l'alcaline phosphatase d'*Escherichia coli* (Bach, Signer, Levinthal et Sizer, 1961), des estérases chez *Tetrahymena pyriformis* (Allen, 1961), de l'acide lactique déshydrogénase chez divers organismes (Wieland et Pfeiderer, 1961; Goldberg et Cather, 1963; Cahn, Kaplan, Levine et Zwilling, 1962) ou de l'acide glutamique déshydrogénase (Talal, Tomkins, Mushinski et Yielding, 1964). Dans ces cas, comme dans celui du gène *D*, les différentes formes de la protéine apparaissent dans des conditions physiologiques différentes.

Quoi qu'il en soit, comme à chaque allèle est associé un type spécifique (avec le sens précisé plus haut) de facteur cytoplasmique, on peut admettre que ces facteurs sont des produits relativement directs de l'activité des gènes, sans doute de nature protéique.

B. — DEGRÉ DE SIGNIFICATION DES TESTS PHÉNOTYPIQUES

Dans le cas d'incompatibilité visible, l'interprétation ne pose pas de problème : toute réaction décelée signifie évidemment la présence des facteurs. La seule difficulté consiste à interpréter l'absence de réaction : on peut en effet se demander si ce phénomène correspond à l'absence effective des facteurs (non synthèse et inactivité des gènes responsables) ou au masquage, dans certaines circonstances, des propriétés de ces facteurs.

Nous avons déjà partiellement répondu à cette question lorsque nous avons souligné que la spécificité de réaction des facteurs d'incompatibilité ne dépendait ni du milieu, ni des autres gènes. Même dans des conditions physiologiques anormales, ce résultat reste valable. Ainsi, nous avons vu que le phénotype d'un court article dépend 1° du gène étudié, 2° de la masse relative du protoplasme, 3° de l'activité métabolique. Certes, les réactions entre hyphes et articles de divers génotypes peuvent présenter des modalités variées; cependant, le caractère immédiat ou différé, affaibli ou intense, de ces réactions ne dépend pas directement de l'état physiologique des cellules, mais essentiellement de la concentration des facteurs cytoplasmiques dans les cellules avant leur isolement (cf., par exemple, le cas des articles C_1 toujours normalement réactifs : tableau XI, p. 670).

En effet, il est hors de doute que la concentration des facteurs cytoplasmiques influence l'allure de la réaction; corrélativement, on peut déduire de l'aspect des réactions des indications sur la concentration des facteurs. Le meilleur exemple à ce sujet est l'étude du phénotype des jeunes thalles issus de spores s^s formées dans les asques hybrides $S \times s^s$. Ces spores ne peuvent synthétiser les facteurs cytoplasmiques S et ceux qui s'y trouvent englobés lors de la délimitation des spores se trouvent fortement dilués au cours de la croissance ultérieure. Or, on observe que ces thalles présentent un phénotype [S] net peu après la germination, puis de plus en plus atténué; les réactions d'incompatibilité avec des testeurs *s*, lorsqu'elles se produisent, ont, en dépit de l'état physiologique normal des cellules, des caractéristiques particulières (cf. chapitre I, troisième partie) qui les distinguent sans ambiguïté des réactions normales entre hyphes *S* et *s*. Le seul déterminisme possible de cette modification des réactions est ici la raréfaction des facteurs S au cours de la croissance. Lorsque des réactions de ce type se retrouvent dans d'autres situations, il est donc raisonnable de leur attribuer la même cause.

Il nous paraît donc que le test phénotypique, non seulement peut renseigner sur la concentration des facteurs cytoplasmiques, mais est aussi suffisamment sensible pour déceler des concentrations très faibles de ces facteurs. L'absence de réaction d'incompatibilité correspon-

drait donc bien à l'absence de facteur ou, du moins, à un niveau de concentration anormalement bas.

On peut donc admettre, étant donné également que ces facteurs sont des molécules de haute spécificité, vraisemblablement des protéines, que les tests phénotypiques renseignent effectivement sur l'activité hétérocatalytique des gènes considérés. Aussi admettons-nous, lorsque nous constatons l'absence d'un facteur cytoplasmique, que le gène correspondant est inactif.

C. — PROPRIÉTÉS DE L'EXPRESSION DES GÈNES

1° Chaque gène possède son rythme propre d'expression.

Dans la mesure où l'on admet que les tests phénotypiques reflètent bien l'activité des gènes correspondants, on peut déterminer pour chaque gène une période définie au cours du cycle où il est actif et où on peut mesurer le degré de cette activité (cf. tableau XXVI, p. 728).

Après la méiose, la mise en activité se fait avec plus ou moins de retard selon les gènes. C'est ainsi que les gènes *S* et C_1 apparaissent tous deux actifs dans l'asque avant la délimitation des spores, ce qui se traduit par la présence des facteurs cytoplasmiques correspondants dans les spores ne contenant pas ces gènes. Cette situation évoque par bien des points l'expression de certains gènes responsables d'autostérilité chez les Phanérogames. Dans le cas où le déterminisme de l'incompatibilité est dit « sporophytique », c'est vraisemblablement aussi l'activité précoce, au cours de la méiose, du gène *S* des plantes hétérozygotes *Ss*, qui communique aux pollens *s* le phénotype [S]; les tubes polliniques de ces derniers pénètrent normalement dans les styles des plantes *ss* et non dans celui des plantes *Ss* (Lewis, 1954). C'est aussi le cas des gènes qui restaurent la fertilité chez les maïs mâles stériles (Buchert, 1961) : certains d'entre eux paraissent actifs avant la délimitation de la tétrade pollinique, d'autres seulement après; dans le premier cas, la totalité du pollen des plantes hétérozygotes est viable; dans le second, seuls les pollens qui contiennent ces gènes sont normaux.

Ces phénomènes de mise en activité immédiate ou retardée des gènes ne sont pas limités, dans le cycle d'un organisme, au stade de la méiose. Dans le cas d'*Escherichia coli*, après conjugaison, le gène *lac* devient actif à son taux maximum 2 ou 3 minutes après sa pénétration dans la bactérie receveuse, avant même qu'il se trouve génétiquement intégré (Jacob, 1958), tandis que le gène responsable de la résistance au diacide de sodium ne l'est qu'après la troisième ou quatrième division du zygote (Hayes, 1954). Chez la Drosophile, le gène *dor*$^+$ apporté par le noyau mâle devient actif dans le cytoplasme femelle avant la formation du noyau zygotique (Counce, 1956).

On retrouve donc chez le *Podospora anserina* le fait que la mise en activité d'un gène s'effectue à un moment précis *caractéristique du gène*. De plus, l'étude du rythme d'expression des gènes d'incompatibilité apporte un certain nombre de précisions intéressantes.

a) La mise en activité de deux gènes allèles n'est pas synchrone.

Dans les conditions usuelles, le gène *S* est toujours phénotypiquement exprimé avant le gène *s*. C'est sans doute aussi le cas pour les gènes B_1 *et* B_2 : on sait en effet que le phénotype juvénile des hétérocaryotes $B_1 + B_2$ est uniquement B_2; comme nous avons déjà montré, dans tous les cas où l'analyse a été possible, que le gène dominant est le gène le plus précoce, on peut admettre que c'est aussi le cas pour B_1 et B_2.

Quel que soit le déterminisme de la mise en activité d'un gène (présence d'un inducteur spécifique, par exemple), il est clair que le moment d'induction n'est pas spécifique du locus mais spécifique du gène. Ce phénomène a sûrement une importance considérable au cours du développement : on sait en effet que la mise en activité des divers gènes se fait dans un ordre constant (Beerman, 1956; Pavan, 1958). On peut aussi penser qu'une mutation qui aurait pour seul effet de retarder le moment de mise en activité d'un gène peut avoir des conséquences perturbatrices ou létales au cours de l'ontogénèse, sans que la mutation elle-même corresponde à une déficience physiologique.

b) Les taux apparents d'activité de deux allèles ne sont pas forcément équivalents.

On note en effet une légère différence de la concentration, dans les cellules, des facteurs S et s d'une part (Beisson-Schecroun, 1962), et des facteurs B_1 et B_2 de l'autre (cf. tableau XI, p. 670). C'est au niveau des microconidies que ces différences sont les plus manifestes; en effet, nous avons vu que le phénotype des microconidies ne dépend que de la quantité de facteurs existant dans les conidiophiores et passivement distribués dans les microconidies au cours de leur formation. Or, l'expression $[R_1]$ est déficiente pour toutes les microconidies, tandis que celle du gène R_2 ne l'est que dans 10 % des cas; celle du gène Z_2 ne l'est que dans 5 microconidies sur 1 000 environ, tandis que celle de son allèle Z_1 l'est pour toutes les microconidies (cf. fig. 5, p. 661). Dans le cas des gènes C_2 et C_4, les différences dans l'activité relative des deux gènes ne semblent pas être accompagnées d'un changement dans la spécificité de leur produit : ces deux allèles sont en effet incompatibles avec le même gène E_3; cependant, l'expression $[C_2]$ est constamment absente des microconidies, tandis que celle du gène C_4 est toujours présente (cf. fig. 5, p. 661).

c) Le moment de mise en activité des gènes dépend de diverses conditions.

Il dépend, au moins dans un cas, de la température. En effet, dans les conditions usuelles (26 à 28°), le gène *S* est toujours exprimé avant le gène *s*. A 18°, le phénomène inverse se produit avec une fréquence non négligeable : l'expression [s] est relativement plus précoce, ou celle du gène *S* plus tardive, à basse température. On voit donc, sur un autre plan, qu'une mutation qui aurait pour effet de modifier le délai de mise en activité d'un gène pourrait, selon les conditions ambiantes, avoir ou ne pas avoir de conséquences défavorables.

Mais surtout, le délai de mise en activité des gènes d'incompatibilité dépend du milieu cytoplasmique. Dans un cytoplasme C_1, la mise en activité des gènes E_2 et *D* est retardée; c'est aussi le cas pour le gène B_1 dans un cytoplasme B_2 (cf. p. 692). On doit également noter, bien que l'interaction entre les gènes *D* et *d* ne se traduise pas par l'incompatibilité cellulaire, une inhibition de l'expression [D] sous l'influence du gène *d* réalisée, comme les précédentes, au cours du développement des spores.

d) Le taux d'activité d'un gène n'est pas forcément constant au cours de la croissance.

C'est le cas du gène C_1 qui subit une diminution d'activité à un moment très précis de l'évolution du thalle. On distingue en effet, pour le gène C_1, deux états : l'un juvénile de forte activité que l'on peut entretenir artificiellement, l'autre adulte où l'activité de ce gène est réduite.

On a trouvé chez d'autres organismes des situations analogues où deux gènes allèles fonctionnent à des taux différents et pendant des périodes distinctes au cours de la croissance (Paigen, 1961; Schwartz, 1962).

2° Chaque gène a sa réponse propre à l'inhibition de son expression.

En comparant au rythme propre d'expression de chaque règne, son expression en présence du gène antagoniste, nous avons constaté que, pour chaque système d'incompatibilité, l'un des gènes inhibait l'expression de l'autre (tableau XXVI, p. 728).

Le fait que l'activité d'un gène puisse être supprimée n'est pas nouveau : on connaît de nombreux exemples où cette activité est réprimée dans des conditions parfaitement définies (induction ou répression). De plus, on sait aussi que certaines mutations peuvent, sans changement apparent de la spécificité du produit, affecter la capa-

cité des gènes à être inactivés (cas des mutations de type constitutif). Dans tous les cas : 1° la nature de l'inducteur ou du répresseur est inconnue, de même que le mécanisme de leur action; seules des hypothèses sont émises (Jacob et Monod, 1963); 2° en ce qui concerne les bactéries où ces phénomènes sont le plus souvent étudiés, la répression est toujours réversible. Les seules indications suggérant que l'état de différenciation des noyaux peut entraîner une inactivation irréversible des gènes, découleraient des expériences de transplantations nucléaires réalisées chez les Amphibiens (King et Briggs, 1956; Fischberg, Gurdon et Elsdale, 1959).

Dans ce cadre général, l'étude de l'inhibition de l'expression des gènes d'incompatibilité apporte quelques précisions intéressantes.

a) Mode d'action du répresseur.

D'après les données actuelles sur le mode d'action des gènes, on peut concevoir deux modalités d'inhibition d'un gène : l'inhibition s'effectuerait soit directement au niveau du gène, soit dans le cytoplasme entre produits d'activité des gènes avant, pendant, ou après leur synthèse. Dans le premier cas, la répression aurait un effet moins immédiat que dans le second, dans la mesure où le gène inhibé était déjà actif au moment de l'arrivée du répresseur.

Dans deux cas relatifs au gène *D*, il paraît possible de préciser à quel stade s'effectue son inhibition.

Nous avons montré (p. 697) que la réduction de taille des spores hétérocaryotiques $C_1d + C_1D$ qui se forment dans les asques hybrides $C_1d \times C_1D$ résultait de la rencontre des facteurs C_1 et D. Des facteurs D sont donc présents et actifs dans ces spores. Cependant, tôt après la germination, l'expression phénotypique du gène *D* est absente. Il semble donc, dans ce cas, que l'action inhibitrice du gène C_1 s'exerce au niveau du gène *D*, ce qui permet d'expliquer le caractère différé de cette inhibition.

Les phénomènes sont différents entre les gènes *D* et *d*. Dans le cas des spores hétérocaryotiques *D* + *d* isolées dans les mêmes croisements (cf. tableau XIV, p. 695), les facteurs D ne se manifestent pas dans le cytoplasme puisque, en dépit de la diffusion dans tout l'asque des facteurs antagonistes C_1, ces spores sont toujours de taille normale. On pourrait supposer que l'interaction des gènes *D* et *d* se traduit par le masquage des propriétés des facteurs D. Cette hypothèse est peu vraisemblable, puisque nous savons qu'il est possible, par une anastomose entre hyphes *D* et *d*, de faire diffuser, dans les cellules *d*, des facteurs D qui y conservent toutes leurs propriétés. Il est donc probable que l'inhibition de l'expression de *D* sous l'influence du gène *d* se réalise par une interaction entre les produits des gènes *D* et *d* entraînant soit

l'inactivation des précurseurs des facteurs, soit le verrouillage de ceux-ci à leur site de synthèse.

Deux mécanismes distincts pourraient donc entraîner l'inhibition d'un même gène. Dans les deux cas, le répresseur apparaît comme un constituant cytoplasmique de haute spécificité.

b) Nature du gène répresseur.

Dans tous les cas, le répresseur d'un gène d'incompatibilité est le produit d'un autre gène d'un locus d'incompatibilité. Dans tout système de gènes antagonistes, chaque gène produit un facteur cytoplasmique qui se présente comme un constituant normal et constant de la cellule.

Le fait que l'un seulement des deux gènes apparaisse comme répresseur résulte sans doute seulement de sa mise en activité plus précoce; dans le couple *Ss*, l'inhibition peut concerner soit le gène *S*, soit le gène *s*, selon que le gène le premier actif est le gène *s* ou le gène *S*, ceci dépendant uniquement de la température au cours de l'évolution des fructifications ♀*s* × ♂*S*. Dans le cas général, on peut admettre que le résultat uniforme d'une interaction (inhibition constante des gènes B_1 ou *D* et E_2 sous l'influence des gènes B_2 ou C_1) ne dépend pas des propriétés spécifiques de chaque gène, mais de circonstances annexes, tenant essentiellement au fait que l'un d'eux s'exprime toujours le premier dans les conditions étudiées. On peut donc supposer que l'on pourrait trouver, pour les différents couples de gènes antagonistes, des conditions susceptibles de renverser la balance.

Il est alors tentant de généraliser ces résultats, ce qui revient à supprimer la dualité entre gènes de régulation et gènes de structure. En effet, dans les cas étudiés, plusieurs processus d'inhibition s'exercent entre gènes allèles. Dans le cas d'allèles, on doit évidemment supposer que ces deux gènes déterminent la synthèse de produits très voisins. Il pourrait aussi en être de même dans les cas où l'incompatibilité fait intervenir deux gènes non allèles. Si tous les phénomènes d'incompatibilité envisagés résultaient, comme cela paraît très probable, d'un même type d'interaction entre molécules de structure très voisine, on serait alors conduit à penser que le mécanisme général de ces interactions concerne des gènes « redondants ». L'hypothèse d'une régulation entre gènes redondants a déjà été envisagée dans le cas des deux isocytochromes c de la levure (Slonimski et al., 1963).

c) Durée de la répression.

La répression n'est pas toujours réversible. On peut relever dans les cas analysés quatre types de réponses.

1° Cas du gène **s.** — La répression est durable mais toujours réversible sous l'influence d'un inducteur qui est le produit de ce gène. Ce

gène a donc les propriétés d'un gène inductible, avec la seule particularité que l'inducteur serait son produit d'activité ou un précurseur ou dérivé de celui-ci.

2° Cas des gènes **D** *et* E_2. — Nous avons vu deux étapes dans cette répression provoquée par le gène C_1. L'inhibition des gènes D et E_2 dans un cytoplasme C_1 est tout d'abord provisoire : elle est en effet constamment levée à un stade très précis du développement des cultures C_1D et C_1E_2. Il est intéressant de remarquer que la levée de cette inhibition correspond à un moment où le taux d'activité du gène C_1 décroît. Cette inhibition temporaire est toujours suivie, quelques heures plus tard, par une suppression définitive dont l'effet paraît intégré à la propre structure de ces deux gènes; tout se passe comme si les gènes D et E_2 avaient véritablement muté vers des états amorphes. Cette modification irréversible d'un gène rappelle beaucoup le phénomène de paramutation décrit entre les gènes R^r et R^{st} chez le Maïs (Brink, 1956).

On a déjà constaté des phénomènes sans doute très voisins, chez les Amphibiens, par transplantation du noyau embryonnaire d'une espèce dans le cytoplasme d'une autre espèce (Fischberg, Gurdon et Elsdale, 1959; Moore, 1959); les noyaux perdent une partie de leur potentialité initiale. Selon les auteurs, ces anomalies correspondraient à des délétions du matériel génétique transplanté, par suite de l'impossibilité de l'auto-reproduction de certains gènes dans le cytoplasme d'une autre espèce.

Il est possible que de telles hypothèses rendent compte de l'inactivation des gènes D et E_2 dans un cytoplasme C_1. Il y a toujours, chez *Podospora anserina*, une inhibition temporaire de ces gènes suivie d'une période d'activité; cependant, nous ignorons si la suppression définitive des expressions [D] et [E_2] correspond à une mutation de type ponctuel ou à une délétion; quel que soit le mécanisme, les noyaux modifiés seront sélectionnés. Cependant, le fait que ce type d'événement est dépendant des conditions de milieu (on ne l'observe jamais lorsque les mycéliums sont cultivés en gouttelette pendante) et du degré d'évolution des cultures, et vraisemblablement aussi qu'il se produit plus d'une fois dans une colonie, implique un déterminisme complexe et précis qui ne paraît avoir rien de commun avec le caractère rare et imprévisible des « mutations ordinaires ». On peut alors penser qu'il s'agit plutôt soit d'une anomalie dans le mécanisme de l'auto-reproduction des gènes D et E_2, en relation avec l'inhibition de leur expression phénotypique, soit d'une modification de la structure du gène sous l'influence du répresseur. Rien momentanément ne permet de trancher, mais il est clair qu'une analyse plus poussée de ce phénomène serait particulièrement intéressante.

3° Cas du gène **S**. — Cette situation, où l'inhibition de l'expression phénotypique d'un gène entraîne la non-multiplication des noyaux

portant ce gène, est tout à fait étonnante. On voit que cette réponse à l'inhibition du gène *S* se répercute à un niveau qui n'implique pas seulement le gène *S* mais la survie de tout un noyau. Il paraît donc vraisemblable que l'état fonctionnel de certains gènes puisse intervenir de manière très spécifique dans l'auto-reproduction de tout le matériel génomique.

Il n'est pas rare de rencontrer, chez les hybrides interspécifiques notamment, des anomalies nucléaires assez semblables. Chez le Tabac, on constate bien souvent l'instabilité génomique des hybrides (Moav et Cameron, 1960; Moav, 1961); alors que la croissance apparaît normale, il se produit au cours des mitoses des pertes très variées du stock chromosomique de l'un des parents. Cette exclusion de matériel nucléaire se retrouve, dans un cas, de manière aussi schématique que pour le couple *Ss* de *Podospora anserina :* un seul gène *(Kl)* de *Nicotiana plumbaginifolia,* introduit à l'état hétérozygotique dans le génome de *N. tabacum,* provoque, après la méiose, l'avortement de tous les pollens ne contenant pas ce gène (Cameron et Moav, 1957).

4° **Le gène D.** — Nous avons déjà montré que l'interaction entre le gène *d* et le gène *D* chez les hétérocaryons *D* + *d* entraîne une inhibition partielle de l'expression [D] dont nous avons signalé qu'elle était réalisée au niveau des spores; nous avons vu aussi que cette interaction entraîne également une diminution de la vitesse de multiplication des noyaux *D*. Il est alors tentant, d'après ce que nous avons dit plus haut, de supposer que la contre-sélection des noyaux *D* a pour origine l'inhibition de l'expression du gène *D*.

D'autres exemples d'élimination totale ou partielle, immédiate ou progressive, de l'un des types nucléaires d'un hétérocaryon ont été décrits sous le terme d' « hétérocaryon incompatibility » (Garnjobst, 1953; Holloway, 1955; Pittenger et Brawner, 1961). Ce type d'interaction se traduit par une très nette dysharmonie dans le taux relatif de multiplication des deux noyaux; le déterminisme de la sélection différentielle des deux composants nucléaires, qui diffèrent seulement par un couple d'allèles, est inconnu, en raison surtout du fait que les deux constituants, lorsqu'ils sont sous forme d'homocaryons, n'ont pas d'expression phénotypique distincte. Par analogie avec le système *Dd,* on peut supposer que cette contre-sélection n'est pas étrangère à un processus possible d'inhibition de l'un des allèles.

En résumé, on peut penser que l'étude des phénomènes d'incompatibilité, mis en évidence chez le *Podospora,* offre un certain nombre de situations variées, toutes favorables à l'analyse des propriétés du fonctionnement des gènes et qu'il serait particulièrement intéressant de préciser la nature chimique des facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité.

CHAPITRE II

RELATION ENTRE L'INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET L'INCOMPATIBILITÉ SEXUELLE

Les diverses manifestations d'incompatibilité que nous avons étudiées chez *Podospora* se ramènent à deux aspects essentiels : incompatibilité cellulaire et incompatibilité sexuelle. Ces deux phénomènes résultent d'une même situation génétique (réunion de deux gènes antagonistes) et d'un même mécanisme physiologique (rencontre des facteurs cytoplasmiques associés aux deux gènes antagonistes). Cependant, si une interaction donnée provoque toujours l'incompatibilité cellulaire, elle ne provoque pas nécessairement l'incompatibilité sexuelle. Deux phénomènes, sans doute d'une portée très générale, expliquent ce résultat : le caractère anisogame de la fécondation d'une part, et, d'autre part, le fait que les noyaux ne paraissent pas avoir d'activité hétérocatalytique au cours de la fécondation.

L'anisogamie est de règle chez les animaux supérieurs et il semble bien aussi que l'activité hétérocatalytique de la plupart des gènes ne commence pas, chez les animaux, au tout début de leur développement : c'est ainsi, par exemple, que l'inhibition de l'activité des gènes par l'actinomycine D n'entrave pas la segmentation de l'œuf et n'est ressentie que plus tard (Brachet, Denis et de Vitry, 1964; Gross et Coussineau, 1964). Dans ces conditions, on conçoit que, si des mécanismes d'incompatibilité plus ou moins comparables à ceux que nous avons décrits chez le *Podospora* existent chez les organismes supérieurs, ils doivent rarement se manifester par de l'incompatibilité sexuelle et, plus fréquemment, par de l'incompatibilité cellulaire.

Effectivement, on connaît de nombreux phénomènes relevant de l'incompatibilité cellulaire (histo-incompatibilité et hybrides inviables) et assez peu de phénomènes d'incompatibilité sexuelle, en dehors de l'auto-incompatibilité chez les végétaux supérieurs. Il est évidemment difficile d'établir un parallélisme entre nos phénomènes d'incompatibilité et ceux observés chez ces organismes, d'autant plus que ces deux aspects, cellulaire et sexuel, de l'incompatibilité, y sont étudiés séparément. Toutefois, il peut être intéressant d'essayer de rechercher si les systèmes d'incompatibilité mis en évidence chez le

Podospora peuvent présenter quelque généralité, par la nature de leur déterminisme génétique ou la nature de leurs manifestations.

Relèvent en premier lieu d'un déterminisme génétique analogue à ceux de l'incompatibilité chez *Podospora anserina,* les phénomènes d'histo-incompatibilité. Ces phénomènes, que l'on peut, *mutatis mutandis,* rapprocher de l'impossibilité d'association des protoplasmes de deux hyphes dans le cas de barrage, résultent, dans les cas où on a pu l'analyser, d'une interaction entre allèles d'un ou plusieurs loci d'histo-incompatibilité. Que les croisements entre les individus porteurs de gènes antagonistes soient fertiles ne peut nous étonner, en raison de ce que nous avons dit plus haut. On sait d'ailleurs que cette histo-incompatibilité est provoquée par la production de types particuliers d'anticorps et que les systèmes cellulaires responsables ne sont individualisés et actifs qu'à une période qui précède ou suit de très peu la naissance des animaux (Billingham, 1958; Burnet, 1958). Mais on ne connaît pas la raison pour laquelle les hétérozygotes portant ces gènes antagonistes se développent normalement. Cependant, un certain nombre de maladies, dans l'espèce humaine en particulier, sont assimilées à une manifestation d'auto-incompatibilité (cf. Boyd, 1956).

Diverses anomalies, apparaissant au cours de la croissance d'hybrides entre races d'une même espèce ou entre espèces différentes, ressemblent d'une manière plus frappante aux anomalies observées dans le développement de nos souches auto-incompatibles. Lorsque leur analyse a pu être faite, la mort des hybrides est provoquée par une interaction entre deux gènes (« complementary lethal genes »). Chez les hybrides obtenus entre certaines races de Blé (Heyne, 1943; Caldwell et Compton, 1943; Hermsen, 1960 et 1963) ou entre espèces différentes appartenant au genre *Triticum* (Sears, 1944; Sachs, 1953), des symptômes très typiques apparaissent, à partir des stades à deux ou à quatre feuilles, sous la forme de taches nécrotiques bien isolées au départ, mais qui s'étendent et confluent au cours du vieillissement des plantes; seules sont atteintes les feuilles et les gaines foliaires. Chez certains hybrides du genre *Nicotiana,* des manifestations analogues sont plus souvent décrites sous le nom de tumeurs (Brieger et Forster, 1943; Kostoff, 1943; Kehr, 1951); ces tumeurs apparaissent tardivement, mais affectent ici la totalité des organes de la plante. Dans le genre *Gossypium,* les tissus d'hybrides se trouvent progressivement envahis par une hyperproduction de liège (Stephens, 1950; Gerstel, 1954). Chez le Riz, seule l'activité méristématique de l'extrémité de la racine est bloquée (Oka, 1956). Dans d'autres cas, on assiste à un dépérissement progressif de l'hybride (Saunders, 1952; Wiebe, 1934; Hollingshead, 1930; Sawant, 1956) apparemment lié, dans certains cas, à un arrêt de la synthèse de la chlorophylle (Neatby, 1933; Smith, 1954). Des situations analogues existent dans le règne animal (pour une revue détaillée, voir Stebbins, 1958, et Dobzhansky, 1951). Chez les Poissons *Platipœcilus maculutus* et *Xyphophorus helleri,* certains gènes qui, chez les premiers, déterminent divers modes de répartition

du pigment, conduisent chez les hybrides à la formation de tumeurs (Gordon, 1948). Chez les Tritons, le développement de l'hybride issu du croisement ♀*Tr. palmatus* × ♂*Salamandra maculosa* s'arrête au début de la gastrulation (Baltzer, 1940) ; à ce stade, à côté de régions saines, se trouvent des tissus où les cellules mortes sont progressivement éliminées et collectées dans le blastocœle.

Il y a aussi une homologie remarquable entre les propriétés de nos souches auto-incompatibles et les particularités du développement d'individus homozygotes pour un gène létal récessif (cf. Hadorn, 1960). Il se produit en effet, chez les homozygotes pour un de ces gènes, un arrêt de la croissance à un stade très précis du développement. A ce stade, seuls certains systèmes cellulaires, différents selon les gènes impliqués, sont sensibles au processus létal; dans le cas du gène *lgl* (Grob, 1952), le développement de la Drosophile est interrompu à la pupaison, car certains disques imaginaux ne sont pas différenciés.

Cette homologie peut permettre de faire une hypothèse très générale sur le déterminisme des processus d'incompatibilité : il se pourrait que l'interaction entre gènes antagonistes provoque le blocage d'une fonction cellulaire vitale, exactement comme peut le faire une mutation.

Ainsi, lorsque l'incompatibilité est provoquée par deux gènes allèles, B_1 et B_2 par exemple, on peut admettre que la mort des cellules résulte du blocage d'une fonction essentielle à la cellule et dépendant du locus B. Les gènes B_1 et B_2 détermineraient, par exemple, deux formes d'un enzyme dont la rencontre entraînerait la formation d'un polymère ou d'une molécule hybride inactifs. Cette hypothèse n'est pas invraisemblable; divers types d'enzymes hybrides sont en effet connus; c'est le cas des estérases chez *Tetrahymena pyriformis* (Allen, 1963) et chez le Maïs (Schwartz, 1962) et de l'alcaline phosphatase chez *Escherichia coli* (Schlesinger et Levinthal, 1963).

Une hypothèse de ce type sur le mécanisme de la réaction d'incompatibilité implique que les gènes antagonistes, même lorsqu'ils ne sont pas allèles, fabriquent des produits très voisins et présentant une haute affinité réciproque; cela revient à admettre également qu'ils assurent dans la cellule une fonction similaire. Ceci est tout à fait conforme avec la capacité d'un gène de barrage à agir comme répresseur du gène antagoniste. Cette interaction réciproque, si spécifique et se traduisant soit par une répression, soit par l'effet létal dû à la rencontre dans le cytoplasme des facteurs associés à ces gènes, se conçoit en effet plus aisément entre gènes et produits de gènes contenant une information très voisine.

Dans tous les exemples précédents, on peut comprendre aisément que ces interactions létales, qui se manifestent chez les hybrides à un stade précis de leur développement, n'aient aucun effet lors de la fécondation, ni au cours des premiers stades du développement : on peut admettre que les gènes responsables n'avaient pas encore commencé leur activité. Si l'on se retourne vers l'incompatibilité sexuelle, la

réussite d'un certain nombre de fécondations entre génotypes incompatibles est surtout explicable en raison de l'anisogamie. C'est le cas de la grande majorité des croisements chez *Podospora anserina* où, au moins dans huit sur neuf des systèmes élémentaires d'incompatibilité, la fécondation n'est possible qu'en raison de la faible concentration des facteurs d'incompatibilité dans le cytoplasme de la microconidie. Le cas de l'interaction C_1D fait exception à cette règle; nous avons montré, en effet, que la réussite des fécondations dépend des propriétés des protopérithèces *D* ou, plus exactement, des propriétés de réactivité immédiate ou retardée du facteur D en présence du facteur antagoniste C_1 (cf. p. 722). C'est la seule interaction de ce type connue chez *Podospora anserina*. C'est le seul cas où la fertilité n'est pas uniquement due à l'anisogamie.

Chez les Phanérogames, les phénomènes d'incompatibilité sexuelle paraissent relever de mécanismes différents. Il se pourrait cependant que le déterminisme en soit semblable. Dans le cas de l'auto-incompatibilité entre un pollen et un style portant un même allèle au locus S par exemple, le déterminisme génétique est tout différent de celui de l'incompatibilité chez *Podospora*, puisque c'est une homologie et non une différence génétique qui détermine l'incompatibilité. Il est intéressant de constater que les hypothèses récentes avancées pour expliquer cette incompatibilité font appel au même type d'interaction entre molécules voisines donnant un complexe inactif (Lewis, 1963) que celle avancée pour expliquer l'incompatibilité entre gènes distincts.

En résumé, il se pourrait que les interactions entre gènes allèles ou gènes appartenant à des loci redondants et entraînant soit l'inviabilité des protoplasmes hybrides, soit leur viabilité au prix de l'inhibition de l'un des gènes antagonistes, puissent rendre compte de nombreux phénomènes d'incompatibilité chez des organismes très divers.

CHAPITRE III

ROLE DE L'INCOMPATIBILITÉ DANS LE PROCESSUS DE SPÉCIATION

En étudiant les phénomènes d'incompatibilité entre six souches sauvages de *Podospora anserina,* nous avons reconnu l'intervention de 15 gènes d'incompatibilité répartis en huit loci distincts. On peut se demander quelle est la signification et le mécanisme de cette accumulation de gènes d'incompatibilité au sein de l'espèce.

On peut sans doute expliquer, au moins en partie, cette accumulation de gènes d'incompatibilité chez *Podospora anserina* de la manière suivante :

1° Cette espèce, pourtant largement répandue dans la nature, se trouve géographiquement pulvérisée en une série de « jordanons » homocaryotiques. On sait que le caractère homocaryotique est une conséquence de l'auto-fertilité des souches et que celle-ci est due à la structure tétrasporée de l'asque et à la post-réduction quasi constante du couple +/—.

2° L'espèce ne possède pas d'organes efficaces de dissémination. En effet, ce champignon n'a pas d'organe de reproduction asexuée. De plus, en tant qu'organes mâles, les microconidies ne peuvent réaliser que très difficilement, même dans une aire limitée, des conditions panmictiques : une forte turbulence de l'air est insuffisante pour les détacher.

Il existe donc ainsi un ensemble de particularités, propres à cette espèce, qui concourent à l'isolement extrinsèque des races locales : effectivement cinq des six souches étudiées proviennent d'une zone très limitée de Normandie et les différences qui les séparent ne sont pas moins importantes que celles qui les distinguent des souches d'autres origines. Si des mécanismes d'isolement étaient absents, il ne pourrait y avoir indépendance totale qu'entre races géographiquement éloignées. Ainsi, chez les plantes autogames, l'existence d'un très léger taux d'allogamie suffit à donner aux types rencontrés dans une vaste aire géographique une certaine parenté génétique; l'amplitude de la variation est néanmoins fonction de l'éloignement géographique et les populations les plus éloignées peuvent être considérées comme pratiquement indépendantes. C'est précisément entre de telles popu-

lations que l'on trouve les phénomènes d'incompatibilité déjà cités (Hermsen, 1962; Amemya et Akemine, 1963). Il paraît très vraisemblable que chez *P. anserina* l'isolement extrinsèque des souches ait pu favoriser, d'une manière que nous essayerons d'analyser plus loin, l'apparition de nombreux systèmes d'incompatibilité.

Etant donné le caractère coprophile du champignon étudié, il doit arriver assez fréquemment que deux mycéliums arrivent au contact l'un de l'autre. Les observations faites permettent de prévoir les conséquences d'une telle situation. Fréquemment, la fertilité des croisements sera faible, qu'il s'agisse de fertilité partielle ou de semi-incompatibilité. Il y aura même stérilité totale, mais moins souvent cependant, puisque l'on sait que cette stérilité nécessite toujours l'intervention de deux systèmes d'incompatibilité, conduisant chacun à la stérilité de l'un des deux croisements réciproques.

Cette dernière modalité entraîne évidemment l'isolement total des deux souches. Dans les cas de fertilité réduite, nous savons que de nombreux descendants (un quart ou plus) seront auto-incompatibles et donc, à moins de mutations, stériles et éliminés. Autrement dit, de toutes les recombinaisons théoriquement possibles, certaines seulement seront viables. Effectivement, un grand nombre de souches sauvages de la nature paraissent correspondre à des recombinaisons entre d'autres souches sauvages (cf. tableau, p. 660). On voit ainsi que, dans cette espèce, l'incompatibilité, qu'elle soit cellulaire ou sexuelle, limite sans les entraver totalement les échanges génétiques entre les races locales.

La même corrélation entre l'isolement extrinsèque et l'existence de systèmes d'incompatibilité s'observe chez de nombreuses autres espèces, mais selon le mode sexué ou asexué de la reproduction, et selon le caractère isogame ou anisogame de la fécondation, l'efficacité du système d'incompatibilité, pour réaliser l'isolement de souches ou races locales, est variable.

Chez les champignons à reproduction asexuée, la variation, en dehors des mutations, peut se réaliser par recombinaison mitotique; mais, s'il y a incompatibilité cellulaire, cette recombinaison ne peut plus s'opérer puisqu'elle requiert l'existence durable de dicaryons. Effectivement, chez *Aspergillus nidulans*, il n'y a pas d'hétérocaryose possible entre souches sauvages d'origines diverses (Grindle, 1963 *a*; Jinks et Grindle, 1963) et aussi très souvent entre mycéliums issus d'une aire géographique limitée (Grindle, 1963 *b*).

Chez les champignons homothalliques, la situation est comparable car l'hétérocaryose est aussi un préliminaire indispensable aux croisements entre deux souches. Ici aussi, les phénomènes d'incompatibilité sexuelle sont la règle entre les souches sauvages (Roper, 1962; Carr et Olive, 1959; Olive, 1963; Raper, 1963). Cette stérilité pose, malgré la reproduction sexuée, les mêmes problèmes que chez les espèces à reproduction asexuée; les limites de telles espèces sont impossibles à préciser.

Chez les champignons hétérothalliques à fécondation anisogame, au contraire, certains systèmes d'incompatibilité ne s'opposent pas, ou pas totalement, à la réalisation des croisements. Il arrive, comme chez *Neurospora crassa* (Garnjobst et Wilson, 1956), que la fertilité soit normale. Il est fréquent aussi qu'elle soit atténuée, comme dans le genre *Helminthosporium* où Nelson (1961 et 1963) a décrit, entre souches d'une même espèce ou entre espèces différentes, une gamme très variée de degrés de fertilité. Nous avons trouvé chez *Podospora* la totalité de ces manifestations sous une forme où l'analyse génétique était possible.

Chez les organismes diploïdes, des systèmes d'incompatibilité tels que ceux que nous avons étudiés doivent se révéler particulièrement efficaces. En effet, la coexistence des deux gènes antagonistes dans chaque noyau se poursuit pendant toute la durée de vie de l'hybride; même si ces gènes ne fonctionnent que dans certains tissus et à un moment très précis du développement, le processus d'incompatibilité peut entraîner la létalité de l'individu hybride ou sa stérilité. Plusieurs mécanismes de ce type ont déjà été cités (cf. p. 744). Chez la Drosophile par exemple, l'absence de différenciation des organes sexuels s'observe chez les hybrides entre espèces très voisines (Lancefield, 1928; Dobzhansky, 1934). Un seul système d'incompatibilité peut entraîner l'isolement de deux espèces ou de deux populations.

Dans tous les cas, on voit que l'apparition de systèmes d'incompatibilité détermine ou renforce l'isolement génétique de souches ou races locales d'une même espèce. Du point de vue génétique, on peut s'interroger sur l'origine de ces mécanismes d'isolement.

Goldschmith (1952) et Lamprecht (1945) pensent qu'à l'origine une seule mutation suffit pour que deux populations se trouvent génétiquement isolées. Effectivement, on trouve au moins trois mécanismes de ce type chez *Podospora*; ce sont ceux où l'incompatibilité est provoquée par deux gènes allèles *(B_1B_2, R_1R_2, Z_1Z_2)*. Cependant, on ne voit pas très bien comment l'allèle muté pourrait se maintenir dans une population pratiquement homogène pour l'autre et de laquelle il serait constamment éliminé. On admettrait plus facilement que les deux allèles incompatibles dérivent, par mutation, d'un gène avec lequel ils seraient tous les deux compatibles. Nous avons recherché systématiquement de tels gènes et nous ne les avons jamais trouvés. Pourtant, cette hypothèse ne peut pas être entièrement rejetée et ceci pour deux raisons :

On connaît, d'une part, des situations où les gènes incompatibles ne conduisent à des effets létaux que dans des conditions tout à fait précises. Dans un cas décrit chez la Drosophile, l'hybride n'est inviable que si la température est élevée; à basse température, au contraire, il est légèrement plus vigoureux que les individus normaux (Dobzhansky, 1945). Chez la Tomate, on retrouve un phénomène analogue : l'hybride entre deux espèces est létal en serre, mais tout à fait normal en plein champ (Sawant, 1956). D'autre part, sur la base de nos résul-

tats, il est possible de proposer une autre explication qui tient compte de l'existence d'inhibition d'expression entre deux gènes antagonistes et du fait que, pour un système élémentaire d'incompatibilité, l'un au moins des deux croisements réciproques a une fertilité normale. Si, par exemple, B_2 mute en B_1, on peut prévoir le sort de cette mutation. Le noyau mutant se trouvant dans un protoplasme B_2, il en résultera l'inhibition de l'expression $[B_1]$ et, du fait de cette inhibition, la possibilité pour les noyaux B_1 de se multiplier. A plus long terme, le sort de cette mutation ne peut être assuré que si le noyau muté s'isole, en particulier dans une microconidie, et participe à une fécondation. Cette possibilité existe puisque nous avons vu que les croisements $B_1 \times B_2$ sont fertiles dans les deux sens. Il paraît probable que des mutations conduisant à des gènes incompatibles, mais n'excluant pas la fertilisation lorsque le gène muté s'isole dans un organe mâle, seront sélectivement favorisées par rapport à des mutations excluant cette possibilité. C'est peut-être là que réside l'explication du fait que l'interaction entre gènes incompatibles ne se manifeste pas, ou seulement de manière dissymétrique, au cours des phénomènes sexuels.

Une autre hypothèse a été proposée par Dobzhansky (1951, p. 203) et Stebbins (1958). Ces auteurs supposent qu'une population homogène de constitution génétique *aabb* se trouve divisée en deux isolats allopatriques; si dans l'un, le gène *a* mute en *A*, dans l'autre le gène *b* en *B*, les deux populations peuvent devenir homozygotes, l'une pour *A*, l'autre pour *B*. Si les deux races deviennent sympatriques, elles se retrouveront intrinsèquement isolées si les hybrides *Aa Bb* sont létaux ou ne peuvent se reproduire.

Si l'on compare les génotypes de trois races géographiques de *Podospora*, on peut obtenir une situation schématiquement comparable à celle proposée par ces auteurs.

Tableau XXVII

Races géographiques	Locus C	Locus E
s	C_1	E_1
S	C_4	E_1
A	C_4	E_2

Le trait indique la combinaison génétique inviable et les flèches la direction éventuelle des mutations, en accord avec l'hypothèse proposée par Dobzhansky.

Il semble donc que des différences génétiques assez simples puissent conduire à un isolement total entre deux races d'une même espèce.

Les conditions préalables pour que de tels mécanismes puissent se différencier requièrent toujours l'allopatrie. Cet isolement extrinsèque est réalisé chez *Podospora anserina*.

Il apparaît donc que l'établissement de systèmes d'incompatibilité, en isolant les souches les unes des autres, peut constituer un facteur important de spéciation. Si maintenant nous comparons cette conclusion aux hypothèses précédemment discutées au sujet du mécanisme de l'interaction entre facteurs d'incompatibilité, il est tentant de formuler une hypothèse reliant les aspects physiologiques et évolutifs de l'incompatibilité chez *Podospora anserina*.

Le rôle évolutif de duplications d'éléments génétiques a été envisagé par différents auteurs (cf. par exemple : Stephens, 1951; Ingram, 1963). Ce rôle se comprend aisément, car toute duplication offre une prise à la variation génétique, sans risque à court terme pour l'organisme. Les loci en plusieurs exemplaires seraient donc plus aisément variables, c'est-à-dire ceux où, pour une même espèce, pourraient s'accumuler le plus de variations. Les loci d'incompatibilité, apparemment, sont dans ce cas. Nous avons par ailleurs été amené à considérer, sur la base de la spécificité des interactions entre facteurs cytoplasmiques d'incompatibilité, que les gènes et facteurs antagonistes pourraient avoir des structures très voisines. Ce doit effectivement être le cas si les différents loci d'incompatibilité, ou du moins certains d'entre eux, correspondent à des redondances, les éléments redondants ayant légèrement divergé par suite de mutation.

En résumé, il paraît clair que l'existence de systèmes d'incompatibilité, tels que ceux que nous avons décrits, joue un rôle important dans la structure de l'espèce. Selon les organismes, ce rôle conduit soit à l'isolement total, soit à un isolement partiel, soit au minimum à l'absence de nombreux génotypes correspondant à des recombinaisons. Quelles que soient les modalités du phénomène, l'origine des gènes d'incompatibilité constitue un problème non encore résolu, dont les solutions sont peut-être multiples. L'hypothèse que de tels gènes naissent par mutation à la suite de duplications préalables serait de nature à faciliter la compréhension de cette origine.

RÉSUMÉ

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire portent sur l'étude des phénomènes d'incompatibilité chez le champignon Ascomycète *Podospora anserina*.

Chez cet organisme, la confrontation entre deux souches sauvages détermine presque toujours la formation d'un « barrage » qui traduit une réaction d'incompatibilité entre les protoplasmes des deux souches. Le barrage s'accompagne souvent d'autres manifestations d'incompatibilité (stérilité et, dans les croisements fertiles, descendants inviables ou anormaux) qui sont analogues à celles qu'on observe, chez les organismes supérieurs, entre espèces différentes ou entre races et parfois même, individus d'une même espèce. Dans quelques cas déjà étudiés chez *Podospora*, le déterminisme génétique de ces phénomènes s'est révélé simple : il correspond à l'interaction de deux gènes seulement.

Nous nous sommes alors proposé de vérifier si le déterminisme génétique de l'incompatibilité chez *Podospora* était toujours aussi simple, en étudiant les relations d'incompatibilité entre six souches sauvages différentes. Nous avons ensuite cherché à préciser par quel mécanisme physiologique une même interaction génétique pouvait entraîner, au moins dans certains cas, l'incompatibilité cellulaire, l'incompatibilité sexuelle et l'apparition de souches F_1 inviables ou anormales.

Les principaux résultats et conclusions de ce travail sont les suivants.

A. — ANALYSE GÉNÉTIQUE DE L'INCOMPATIBILITÉ

Dans les six souches sauvages étudiées, confrontées et croisées de toutes les manières possibles, nous avons reconnu l'intervention de 15 gènes d'incompatibilité répartis en huit loci et déterminant neuf systèmes d'interaction entre deux gènes, allèles (dans 4 cas) ou non allèles (5 cas). Chez les descendants des croisements de ces six souches, chacun de ces gènes peut être isolé par recombinaison et étudié séparément.

Chaque système élémentaire d'interaction se caractérise par un spectre défini de conséquences. Entre deux souches portant respectivement l'un et l'autre gène antagoniste, il y a toujours incompatibilité cellulaire et une partie de la descendance est toujours anormale. Pour quelques-uns de ces systèmes, un développement anormal des asco-

spores, une incompatibilité sexuelle ou les deux réunis, s'ajoutent à ces anomalies.

Lorsqu'il y a incompatibilité sexuelle, celle-ci n'affecte qu'un des deux croisements réciproques. Les deux gènes antagonistes n'ont donc pas toujours un rôle symétrique et, d'une manière générale, le résultat de chaque interaction dépend visiblement, d'une part, des propriétés de chaque gène et, d'autre part, des conditions physiologiques (température, nature des éléments confrontés, etc.).

B. — ANALYSE PHYSIOLOGIQUE DE L'INCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE ET SEXUELLE. CYCLE D'ACTIVITÉ DES GÈNES DE BARRAGE

1° Les intermédiaires cytoplasmiques des gènes de barrage.

L'utilisation de techniques microchirurgicales et l'observation microscopique de la réaction de barrage nous ont permis de montrer que l'incompatibilité cellulaire résulte de l'interaction de deux types de facteurs cytoplasmiques dépendant des deux gènes antagonistes. L'étude des réactions de barrage dans différentes conditions indique que la vitesse et l'intensité d'une réaction dépend de la concentration des facteurs cytoplasmiques en jeu. Lorsque la concentration de l'un au moins des facteurs décroît, les réactions sont de plus en plus différées et atténuées jusqu'à l'absence totale de réaction.

La stabilité et la haute spécificité de ces facteurs cytoplasmiques, qui est indépendante du reste du génotype et des conditions externes, suggèrent qu'ils sont de nature protéique; ils peuvent être considérés comme des produits assez directs de l'activité des gènes correspondants.

2° Mécanisme de l'incompatibilité sexuelle.

Une étude détaillée des modalités de l'incompatibilité sexuelle, dans plusieurs cas, nous a montré que l'échec d'une fécondation résultait d'une réaction d'incompatibilité plus ou moins précoce entre les éléments sexuels, mâle (microconidie) et femelle (trychogyne), aboutissant à la mort ou à l'élimination de la microconidie. La fécondation s'opère normalement si la microconidie est dépourvue de facteur cytoplasmique d'incompatibilité ou si la réaction d'incompatibilité est lente par rapport à la vitesse de migration du noyau mâle vers l'ascogone.

3° Expression des gènes de barrage au cours du cycle de l'organisme.

Soit par un test direct, soit par déductions tirées de l'analyse de divers phénomènes, nous avons pu déterminer si les facteurs cytoplasmiques associés aux différents gènes étaient ou non présents — et à quelle concentration — à tous les stades du cycle, depuis la méiose et avant la délimitation des spores, jusque dans les organes sexuels mâles et femelles. Nous avons constaté que chaque gène de barrage se caractérisait par une période et un taux définis d'activité au cours du cycle. De plus, la reprise d'activité, après la méiose, de deux gènes antagonistes est toujours décalée dans le temps.

C. — ANALYSE DES AUTRES MANIFESTATIONS D'INCOMPATIBILITÉ. INHIBITION DES GÈNES DE BARRAGE

Dans le cas où l'interaction concerne deux gènes non allèles, qui peuvent se trouver recombinés dans le même noyau, ou deux gènes allèles réunis dans une même spore hétérocaryotique, on obtient des descendants « auto-incompatibles » qui présentent une évolution caractéristique : 1° la germination des spores et les premiers stades de la croissance sont toujours normaux; 2° presque toutes les cellules deviennent, à un moment précis, le siège de réactions de barrage et meurent; 3° enfin, la croissance reprend à partir de cellules survivantes et reste définitivement normale.

Cette évolution traduit : 1° l'inhibition de l'un des deux gènes antagonistes par l'autre; le gène inhibé est toujours celui dont la reprise d'activité, après la méiose, est la plus tardive; 2° la réapparition de l'expression phénotypique du gène inhibé, à un moment où la concentration des facteurs cytoplasmiques antagonistes décroît; 3° pour deux des gènes étudiés, une apparente mutation du gène inhibé vers un état héréditaire amorphe. Dans les autres cas, la réponse à l'inhibition varie selon les gènes : reprise normale de l'activité, suppression durable mais non définitive de l'activité ou, enfin, arrêt de la multiplication des noyaux.

Cette étude des gènes d'incompatibilité nous a conduit à discuter nos résultats dans le cadre du problème très général du mode de fonctionnement des gènes. Le fait, par exemple, que la mise en activité de deux gènes allèles ne soit pas synchrone, ou que le produit d'un gène agisse comme inhibiteur spécifique de l'activité d'un autre gène,

allèle ou non du premier, ou encore le fait que l'on retrouve des types très divers de réponses à cette inhibition, ont des implications sur les mécanismes de régulation qui sont envisagés dans la discussion.

Dans le domaine de l'incompatibilité, nous avons été amené à envisager, d'une manière générale, les relations entre l'incompatibilité cellulaire et l'incompatibilité sexuelle et leurs effets en tant que mécanisme de spéciation.

Cette étude des modalités d'interaction entre gènes d'incompatibilité : réaction d'incompatibilité d'une part, et inhibition de leur expression d'autre part, nous conduit à penser que l'incompatibilité pourrait résulter d'interactions entre gènes ayant des fonctions identiques ou très voisines et qui auraient divergé par mutation.

SUMMARY

The researches reported here deal with incompatibility phenomena in the Ascomycete *Podospora anserina.*

In this organism, confrontation between two wild strain nearly always brings about the formation of a « barrage » which corresponds to an incompatibility reaction between the protoplasma of the two strains. The barrage is most often accompanied by other incompatibility manifestations such as sterility, or non viable or abnormal offsprings in fertile crosses, these manifestations being similar to those which are found in higher organisms, between different species, or between races and even between individuals of the same species. In some previously studied cases in *Podospora,* the genetic determinism of these phenomena appeared to be very simple : it depends on the action of two genes only.

In order to determine if the determinism of this incompatibility in *Podospora* is always as simple we studied the incompatibility relationships between six different wild strains. Furthermore, we tried to precise by which physiological mechanism a single genic interaction could, at least in some cases, result in cellular incompatibility, sexual incompatibility and appearance of non-viable or abnormal F_1 strains.

The main results and conclusions of this work are the following.

1° Genetic analysis of incompatibility.

The six wild strains on study were confronted and crossed in all possible combinations. We found fifteen incompatibility genes involving eight loci and governing nine interaction systems between either two allele genes (four cases) or non allele genes (five cases). Each of those genes can be isolated by recombination and independantly studied in the offsprings of crosses between the six strains.

Each elementary interaction system has its own definite range of consequences. Between a strain carrying one gene and the strain carrying the antagonistic gene, one always observes cellular incompatibility and part of the offsprings is always abnormal. Moreover, for some of those systems, abnormal development of ascospores or sexual incompatibility, or both, are also observed.

Whenever sexual incompatibility occurs, it affects only one of the

two reciprocal crosses. Thus, the two antagonistic genes do not always play symetrical parts, and, generally speaking, the result of each interaction depends on the characteristics of each gener and on the physiological milieu (temperature, nature of the confronted elements, etc.).

2° Physiological analysis of cellular and sexual incompatibility; activity cycle of barrage genes.

*a) **Cytoplasmic products of barrage genes.*** — Using microsurgery methods and microscopial examination of barrage reaction we were able to show that cellular incompatibility arises from interaction between two kinds of cytoplasmic factors depending on the two antagonistic genes. Study of barrage reactions in different conditions shows that the speed and intensity of a reaction depend on the concentrations of these cytoplasmic factors. The lower the concentration of one at least of the factors is, the later and the slighter the reactions occur until no reaction at all occurs.

The stability and the high specificity of these cytoplasmic factors — which depend neither on the other genes of genomes nor on the external conditions — suggest that they are of proteic nature; they may be considered as fairly direct products of activity of the corresponding genes.

*b) **Mechanism of sexual incompatibility.*** — A detailed study of the modality of many cases of sexual incompatibility showed that unsuccessful fecundation are due to more or less early incompatibility reaction between male (microconidia) and female (trichogyne) sexual organs, reaction which leads to death or elimination of microconidia. Fecundation takes place when the microconidia does not carry any cytoplasmic incompatibility factor or when the incompatibility reaction is slow with respect to speed of migration of the male nucleus towards the ascogone.

*c) **The expression of barrage genes in the course of the organism life cycle.*** — Either by direct testing or by deductions drawn out of analysis of different phenomena, we were able to determine whether the cytoplasmic factors associated with the different genes were present or not — and up to what concentration — in each of the life — cycle stages, from meiosis on and before the formation of the spores until the stage of formation of sexual male and female organs. We thus found that each barrage gene can be characterized by its period and rate of activity throughout the life cycle. Furthermore, after meiosis, antagonistic genes do nor resume their activity at the same time.

3° Analysis of other incompatibility expressions : inhibition of barrage genes.

When an interaction involves two non allele genes (which can be recombined inside the same nucleus) or two allele genes within a single heterocaryotic spore, the offsprings show « self-incompatibility » and follow a characteristic evolution : 1° the spore germination and the first stages of growth are always normal; 2° in almost all cells, a barrage reaction occurs at a specific time and the cells die; 3° finally, the surviving cells resume growth and growth is forever normal. This évolution corresponds to : 1° inhibition of one of the two antagonistic genes by the other one; the inhibited gene is always the one the activity of which normally starts the later after meiosis; 2° reapparance of the phenotypic expression at a time when the concentration of the antagonistic factor decreases; 3° for two of the studied genes, a probable mutation of the inhibited gene to an hereditary inactive state. In the other cases, the response to inhibition varies with the genes : either it resumes a normal activity or this activity is suppressed but not irreversibly, or the whole nuclei stop multiplying.

This study of incompatibility genes led us to discuss our results in relation to the problem of gene expression. For example the fact that the activities of two allele genes don't start synchroniously, or that the product of one gene inhibits specifically the activity of another allelic or non allelic gene, or even the fact that several different types of responses to inhibition can be found, have a bearing on the mechanisms of regulation which is outlined in the discussion.

As for incompatibility phenomena, we considered them in a more generally way, relationship between cellular and sexual incompatibility, and their role as mechanisms of speciation.

This study of the modalities of interaction between incompatibility genes : incompatibility reaction on the one hand and inhibition of their expression on the other hand suggers that incompatibility might result from interactions between genes, identical or similar in their functions which would have diverged by mutation.

BIBLIOGRAPHIE

Allen (S. L.), 1961. — Genetic control of the esterases in the Protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, **94**, p. 753.

Amemya (A.) et Akemine (H.), 1963. — Biochemical studies on the root inhibiting complementary lethal factors in Rice plant. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sc.* Japan.

Ames (L. M.), 1934. — Hermaphroditism involving self-sterility and cross-fertility in the Ascomycete *Pleurage anserina*. *Mycologia*, **25**, p. 43.

Bach (M. L.), Signer (E. R.), Levinthal (C.) et Sizer (I. W.), 1961. — The electrophoretic patterns of alkaline phosphatase from various *E. coli* mutants. *Feder. Proc.*, **20**, p. 225.

Baltzer (F.), 1940 *a*. — Ueber erbliche entwicklung und Austauchschbarkeit artverschiedener Kerne bei bastarden. *Naturwissenschaften*, **28**, *(12)*, p. 177, et *(13)*, p. 196. — 1940 *b*. Das Problem der Entwicklung embryonaler bastard Transplantate. *Bull. Soc. Ital. Biol. Exp.*, **15**, p. 39.

Beerman (W.), 1956. — Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **21**, p. 217.

Beisson-Schecroun (J.), 1962. — Incompatibilité cellulaire et interactions nucléocytoplasmiques dans les phénomènes de « barrage ». *Ann. Gen.*, **4**, n° 1.

Bernet (J.), 1963. — Action de la température sur les modifications de l'incompatibilité cytoplasmique et les modalités de la compatibilité sexuelle entre certaines souches de *Podospora anserina*. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **4**, n° 2, p. 205.

Bernet (J.), Esser (K.), Marcou (D.) et Schecroun (J.), 1960. — Sur la structure génétique de l'espèce *Podospora anserina* et sur l'intérêt de cette structure pour des recherches de génétique. *C. R. Acad. Sc.*, **250**, p. 2053.

Boyd (W. C.), 1956. — *Fundamentals of Immunology*. Interscience Publishers Inc. N. Y., p. 473.

Brachet (J.), Denis (H.) et Vitry (F. de), 1964. — The effects of actinomycin D and puromycin on morphogenesis in Amphibian Eggs and *Acetabularia mediterranea*. *Develop. Biol.*, **9**, p. 398.

Brieger (F.) et Forster (R.), 1942. — Tumores en certo hibridos do genero *Nicotiana*. *Bragantia*, **2**, p. 249.

Brink (R. A.), 1956. — A genetic change associated with the R. locus in Maïze which is directed and potentially reversible. *Genetics*, **41**, n° 6, p. 872.

Buchert (J. G.), 1961. — The stage of genome-plasmon interaction in the restoration of fertility to cytoplasmically pollen sterile Maïze. *Proc. Nat. Acad. Sc., U. S*, **47**, p. 1436.

Cahn (R. D.), Kaplan (N. O.), Levine (L.) et Zwilling (E.), 1962. — Nature and development of lactic deshydrogenase. *Science*, **136**, p. 692.

Caldwell (R. M.) et Compton (L. E.), 1943. — Complementary lethal genes in wheat. *J. Hered.*, **34**, p. 67.

Cameron (D. R.) et Moav (R.), 1957. — Inheritance in *Nicotiana tabacum*. An allien genetic locus inducing abortion of microspores not carrying it. *Genetics*, **42**, p. 326.

Carr (A. J. H.) et Olive (L. S.), 1959. — Genetics of *Sordaria fimicola*. III. Cross-compatibility among self-sterile and self-fertile cultures. *Amer. J. Bot.*, **46**, p. 81.

Counce (S. J.), 1956. — Studies on female sterility genes in *Drosophila melanogaster*. I. The effects of the gene *deep orange* on embryonic development. *Z. indukt. Abs. - U Vererbungslehre*, **87**, p. 447.

De Fonbrune (P.), 1949. — *Technique de micromanipulation*. Masson et C^ie^, édit., Paris.

Dobzhansky (Th.), 1934. — Studies on hybrid sterility. I. Spermatogenesis in pure and hybrid *Drosophila pseudoobscura*. *Zeit Zelif. Anat.*, **21**, p. 169. — 1946. Genetics of natural population. XIII. Recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **31**, p. 269. — 1951. *Genetics and the origin of species*. Chap. VII : Isolation mechanism (Columbia University Press, N. Y.).

Esser (K.), 1954. — Sur le déterminisme d'un nouveau type d'incompatibilité chez *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sc.*, **205**, p. 2053. — 1959 *a*. Die Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina*. II. Die Wirkungsweise der semi-Incompatibilitätsgene. *Zeit. für Vererbungslehre*, **90**, p. 29. — 1959 *b*. Incompatibilitätsbeziehungen zwischen geographischen Rassen von *Podospora anserina*. III. Untersuchungen zur Genphysiologie der Barragebildung und semi-Incompatibilität. *Zeit. für Vererbungslehre*, **20**, p. 445. — 1964. Heterogenic incompatibility. *Proc. Tenth Int. Bot. Cong.*, Edinburgh.

Fischberg (M.), Gurdon (J. B.) et Elsdale (T. R.), 1959. — Nuclear transfer in Amphibia and the problem of the potentialities of the nuclei of differentiating tissues. *Exp. Cell Res.*, **6**, p. 161.

Garnjobst (L.), 1953. — Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Amer. J. Bot.*, **40**, 607. — 1955. Further analysis of genetic control of heterocaryosis. *Amer. J. Bot.*, **42**, p. 444.

Garnjobst (L.) et Wilson (J. F.), 1956. — Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sc., U. S.*, **42**, p. 613.

Gerstel (D. V.), 1954. — A new lethal combination in interspecific cotton hybrids. *Genetics*, **39**, p. 628.

Goldberg (E.) et Cather (J. M.), 1963. — Molecular heterogeneity of lactic deshydrogenase during development of the snail *Argobuccinum oregonense Redfield*. *J. Cell and Comp. Physiol.*, **61**, p. 31.

Goldschmidt (R. B.), 1952. — Evolution as viewed by one geneticist. Amer. *Scientist*, **40**, p. 84.

Gordon (M.), 1948. — Effects of five primary genes on the site of melanomas in fishes and the influence of two color genes in their pigmentation. The Biology of melanomas. *Proc. Nat. Acad. Sc., N. Y.*, **4**, p. 216.

Grindle (M.), 1963 *a*. — Heterocaryon compatibility of unrelated strain in the *Aspergillus nidulans* group. *Heredity*, **18**, n° 2, p. 191. — 1963 *b*. Heterocaryon compatibility of closely related wild isolates of *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, **18**, n° 4, p. 397.

Gross (P. R.) et Coussineau (G. H.), 1964. — Macromolecular synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Exp. Cell Res.*, **33**, p. 368.

Hadorn (E.), 1961. — *Developmental genetics and lethal factors*. London Methuen C. O. L. T. P.; John Wiley, N. Y.

Hayes (W.), 1957. — The phenotypic expression of genes determining various types of drug resistance following their inheritance by sensitive bacteria. In : *Drug resistance in Microorganisms*, Eds. Wolstenhome G. E. W. et O'Connor C. M., Ciba Foundation Symposium.

Hébert (T. T.) et Middleton (G. K.), 1955. — Lethality in wheat cross. *Agron. J.*, **47**, p. 196.

Hermsen (J. G. Th.), 1960. — Quantitative progressive necrosis in wheat hybrids. *Euphytica*, **9**, p. 141. — 1962. Sources and distribution of the complementary genes for hybrid necrosis in wheat. *Euphytica*, **12**. — 1963. The genetic basis of hybrid necrosis in wheat. *Genetica*, **33**, p. 245.

Heyne (E. G.), Wiebe (G. A.) et Painter (R. H.), 1943. — Complementary genes in wheat. *J. Hered.*, **34**, p. 243.

Hollingshead (L.), 1930. — A lethal factor in *Crepis* effective only in an interspecific hybrid. *Genetics*, **36**, p. 114.

Holloway (B. W.), 1955. — Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **4**, p. 117.

Ingram (V. M.), 1963. — *The hemoglobins. Genetics and Evolution*. Columbia University Press, N. Y. and London.

JACOB (F.), 1959. — Transfer and expression of genetic information in *Escherichia coli* K12. *Exp. Cell Res.* **6**, p. 51.

JACOB (F.) et MONOD (J.), 1963. — Déterminisme et régulation spécifique de la synthèse des protéines. *Proc. Intern. Cong. Bioch.*, Pergamon Press.

JINKS (J. L.) et GRINDLE (M.), 1963. — The genetical basis of heterocaryon incompatibility in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, **18**, n° 4, p. 407.

KEHR (A. E.), 1951. — Genetic tumors in *Nicotiana*. *Amer. Nat.*, **85**, p. 51.

KEHR (A. E.) et SMITH (H. H.), 1954. — Genetic tumors in *Nicotiana* hybrids. Abnormal and pathological plant growth. *Brookhaven Symp. Biol.*, **6**, p. 55.

KING (J. J.) et BRIGGS (R.), 1956. — Serial transplantation of embryonic nuclei. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **21**, p. 271.

KOSTOFF (D.), 1943. — Cytogenetics of the genus *Nicotiana*. 1.073 State's Printing House Sofia.

LAMPRECHT (H.), 1945. — Intra and interspecific genes. *Agr. Hort. Gen.*, **3**, p. 45.

LANCEFIELD (D. E.), 1929. — A genetic study of two races or physiological races in *Drosophila obscura*. *Z. I. A. V.*, **52**, p. 287.

LEWIS (D.), 1954. — Comparative incompatibility in Angiosperms and Fungi. *Adv. genet.*, **6**, p. 235. — 1963. A protein dimer hypothesis on incompatibility. *Proc. XIth Cong. Gen.*, **3**, p. 657.

MARCOU (D.), 1962. — Notion de longévité et nature cytoplasmique du déterminant de la sénescence chez quelques champignons. *Ann. Sc. Nat., Bot.*, **2**, n° 4, p. 653.

MOAV (R.), 1961. — Genetic instability in *Nicotiana* hybrids. Studies on the Ws (pbg) locus of *N. plumbaginifolia* in *N. tabacum* nuclei. *Genetics*, **46**, p. 1069.

MOAV (R.) et CAMERON (D. R.), 1960. — Genetic instability in *Nicotiana* hybrids. The expression of instability in *N. tabacum* and *N. plumbaginifolia*. *Amer. J. Bot.*, **47**, p. 87.

MONNOT (F.), 1953. — Sur la possibilité de réaliser des croisements réciproques chez l'Ascomycète *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sc.*, **236**, p. 2263.

MOORE (A. J.), 1959. — The transfer of haploid nuclei between *Rana pipiens* and *Rana sylvatica*. *Exp. Cell Res.*, **6**, p. 179.

NEATBY (K. W.), 1933. — A chlorophyll mutation in wheat. *J. Hered.*, **24**, p. 159.

NELSON (R. R.), 1961. — The significance of interspecific hybridization in the evolution of pathogenicity in the genus *Helminthosporium*. *J. Elisha Mitchell Soc.*, **77**, p. 107. — 1963. Interspecific hybridization in the Fungi. *Symp. on fungal Genetics, Mycologia*, **15**, p. 104.

OKA (H.), 1956. — Complementary dominant lethal genes in rice. *Ann. Report Nat. Gen., Japan*, **7**, n° 22, p. 37. — 1957. Phylogenetic differentiation of cultivated rice. Complementary lethal genes in rice. *Japan J. Gen.*, **32**, p. 83.

OLIVE (L. S.), 1963. — Genetics of homothallic fungi. *Symp. on fungal genetics, Mycologia*, **15**, p. 92.

PAIGEN (K.), 1961. — The genetic control of enzyme activity during differentiation. *Proc. Nat. Acad. Sc., U. S.*, **47**, p. 1641.

PAVAN (C.), 1958. — Morphological and physiological aspects of chromosome activities. *Proc. 10th Int. Congr. Genet.*, Montréal, **1**, p. 251.

PITTENGER (T. H.) et ATWOOD (K. C.), 1956. — Stability of nuclear proportions during growth of *Neurospora* heterocaryons. *Genetics*, **41**, p. 227.

PITTENGER (T. H.) et BRAWNER (T. G.), 1961. — Genetic control of nuclear selection in *Neurospora* heterocaryons. *Genetics*, **46**, p. 1645.

RAPER (J. R.), 1963. — Patterns of sexuality in fungi. *Symp. on fungal genetics, Mycologia*, **15**, p. 79.

RIZET (G.), 1941. — Les résultats d'ordre génétique et le problème de la sexualité chez l'Ascomycète *Podospora anserina*. *Rev. Mycol.*, **7**, p. 97. — 1953. Sur la multiplicité des mécanismes conduisant à des barrages chez *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sc.*, **237**, p. 666.

RIZET (G.) et ENGELMAN (C.), 1949. — Contribution à l'étude d'un Ascomycète tétrasporé : *Podospora anserina* (Ces) *Rehm. Rev. Cytol. et Biol. Veg.*, **11**, p. 201.

Rizet (G.) et Esser (K.), 1953. — Sur les phénomènes d'incompatibilité entre souches d'origine géographique différente chez *P. anserina*. *C. R. Acad. Sc.*, **237**, p. 760.

Rizet (G.) et Schecroun (J.), 1959. — Sur les facteurs cytoplasmiques associés au couple de gènes *S-s* chez le *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sc.*, **249**, p. 2392.

Roper (J. A.), 1962. — Genetics and microbial classification. *Symp. Soc. Gen. Microbial*, **12**, p. 270.

Sachs (L.), 1953. — The occurrence of hybrid semi-lethal and the cytology of *Triticum macha* and *Tr. Vavilovi*. *J. Agr. Sc.*, **43**, p. 204.

Saunders (A. R.), 1960. — Complementary lethal genes in the cowpea *(Vigna sinensis)*. Lethal combinations. *South Afr. J. Agr. Sc.*, **34**, p. 497.

Sawant (A. C.), 1956. — Semi-lethal complementary factors in tomato species hybrids. *Evolution*, **10**, p. 93.

Schwartz (D.), 1962 *a*. — Genetic studies on mutant enzymes in Maïze. II. On the mode of synthesis of the hybrid enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sc., U. S.*, **48**, p. 750. — 1962 *b*. III. Control of gene action in the synthesis of pH 5 esterase. *Genetics*, **47**, p. 1609.

Schlesinger (M. J.) et Levinthal (C.), 1963. — Hydrid protein formation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase leading to *in vitro* complementation. *J. Mol. Biol.*, **7**, p. 1.

Sears (E. R.), 1944. — Inviability of intergeneric hybrid involving *Triticum monococum* and *Tr. œgilopoïdes*. *Genetics*, **29**, p. 113.

Slonimski (P. P.), Acher (R.), Père (G.), Sels (A.) et Somlo (M.), 1963. — Isocytochromes c. *Int. Symp. Mech. Regul. Cell activities in Microorganisms*, Gordon and Breach Ltd, N. Y.

Smith (W. K.), 1954. — Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. *Genetics*, **30**, p. 268.

Stebbins (G. L.), 1958. — The inviability, weakness and sterility of interspecific hybrids. *Adv. Genet.*, **9**, p. 147.

Stephens (S. G.), 1950. — The internal mechanism of speciation in *Gossypium*. *Bot. Rev.*, **16**, p. 115. — 1951. Possible significance of duplication in evolution. *Adv. Genet.*, **4**, p. 247.

Talal (N.), Tomkins (G. M.), Mushinki (J. F.) et Yielding (K. L.), 1964. — Immunological evidence for multiple molecular forms of crystalline glutamic deshydrogenase. *J. Mol. Biol.*, **8**, p. 46.

Wiebe (G. A.), 1934. — Complementary factors in barley giving a lethal progeny. *J. Hered.*, **25**, p. 272.

Wieland (Th.) et Pfeiderer (G.), 1961. — Chemical differences between multiple forms of lactic acid deshydrogenase. *Ann. Acad. Sc., N. Y.*, **94**, p. 691.

Wilson (J. F.), Garnjobst (L.) et Tatum (E. L.), 1961. — Heterocaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. Microinjection studies. *Amer. J. Bot.*, **48**, p. 294.

PLANCHES I ET II

PLANCHE I

A. Paquet d'asques étalé, montrant des asques normaux à 4 ascospores et un asque anormal à 2 ascospores uninucléées et 3 binucléées. (× 160.)

B. Protopérithèces à la surface d'une culture sur milieu gélosé. (× 100.)

C. Hyphes conidiophores. (× 1 050.)

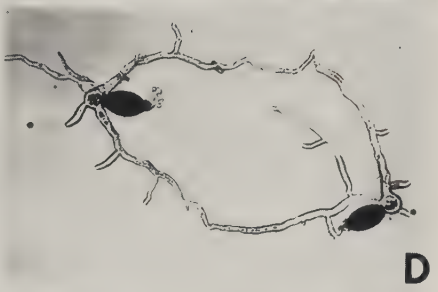
D. Anastomose entre jeunes hyphes, environ 4 heures après la germination des ascospores. (× 300.)

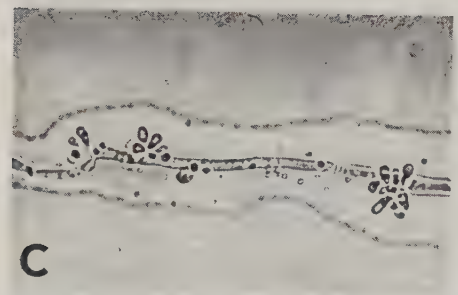
E. Spores de taille réduite dans les asques issus du croisement ♀s × ♂A ou *D* × *C*$_1$. (× 160.)

F. Spores avortées dans les asques issus du croisement ♀*s* × ♂*F* ou ♀*s* × ♂*S*. (× 500.)

A

B


D


C

E

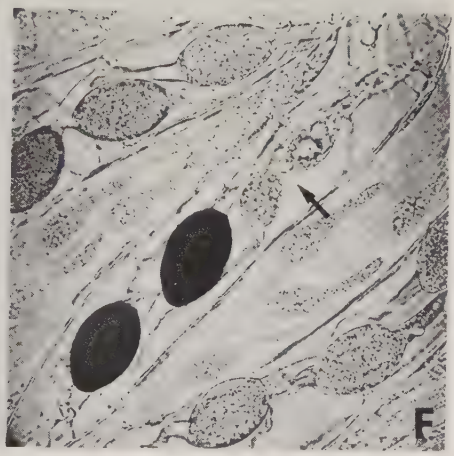

F

PLANCHE II

A. Résultat de la réaction d'incompatibilité entre deux hyphes : une zone morte s'étend de part et d'autre du point d'anastomose. (× 1 050.)

B. Thalle C_1E_2 cultivé en gouttelette pendante et âgé de 15 heures environ. Les processus d'auto-incompatibilité sont déjà très avancés : la flèche indique un article survivant. (× 300.)

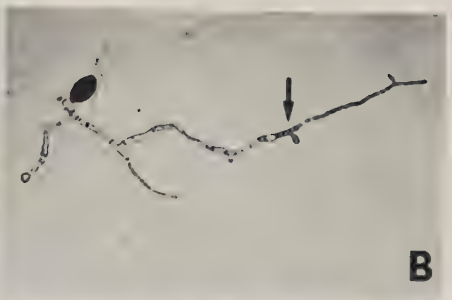
C. Thalle C_1D. Le processus létal est moins avancé que dans le cas représenté sur la photo B. On discerne quelques cellules mortes. (× 100.)

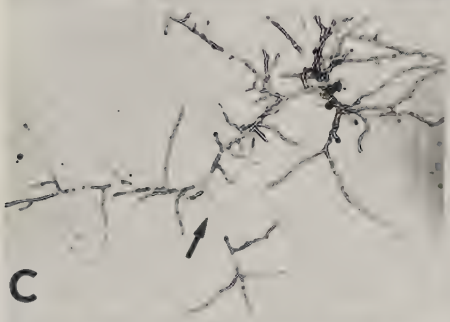
D. Détail d'une hyphe d'un mycélium C_1D plus âgé que celui de la photo C. Cette hyphe est cloisonnée en très courts articles; l'article resté sain présente un aspect anormal. (× 1 050.)

E. Résultat de la fécondation de protopérithèces *D* de type I par des microconidies C_1. La comparaison de ces protopérithèces avec ceux de la photo B (planche I) montre le grossissement de leur taille consécutif à l'apport de microconidies C_1. Les protopérithèces E_2 se comportent de la même manière. (× 100.)

F. Résultat de la fécondation de protopérithèces *D* de type II avec des microconidies C_1. L'accroissement de leur taille, consécutif à l'apport des microconidies C_1 est supérieur à celui des protopérithèces de la photo E. (× 100.)

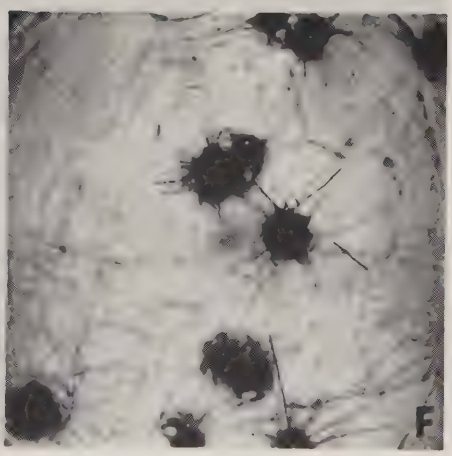
A


B


C

D

E


F

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LES MUTANTS LÉTAUX CONDITIONNELS DU PHAGE T_4

Vu et approuvé :

Paris, le 4 juin 1965.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. Bergerard.

Vu

et permis d'imprimer :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

J. Roche.

Soulisse et Cassegrain, Imp., Niort. Dépôt légal : 4e trim. 1965. N° d'ordre : 686.
Masson et Cie, Edit., Paris. Dépôt légal : 4e trim. 1965. N° d'ordre : 4190.
(Printed in France.)